

Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Nathalie BOULET

Le vendredi 30 janvier 2015

Titre :

ROLES DES BONE MORPHOGENETIC PROTEINS DANS LA CONVERSION
ADIPOCYTAIRE ET LE DEVELOPPEMENT DU TISSU ADIPEUX HUMAIN

ED BSB : Physiopathologie

Unité de recherche :

INSERM/UPS UMR1048 - Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, Equipe 1

Directeur(s) de Thèse :

Dr Jean GALITZKY

Dr Anne BOULOUMIE

Rapporteurs :

Dr Jean-François TANTI

Dr Ez-Zoubir AMRI

Autre(s) membre(s) du jury :

Pr Philippe VALET

Dr Joan TORDJMAN

Je tiens tout d'abord à remercier les docteurs Jean-François Tanti, Ez-Zoubir Amri et Joan Tordjman de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail. Je remercie également monsieur le professeur Philippe Valet d'avoir si gentiment accepté de faire partie de ce jury, et pour vos conseils tout au long de mon parcours.

Je n'ai jamais rêvé « d'être chercheur quand je serai grande », mais j'aimais la biologie. Admirer et essayer de comprendre la mécanique du corps. Pourquoi le tissu adipeux ? Il faut dire qu'il est bien vendu par nos enseignants à Toulouse. Et peut-être aussi à cause d'une sorte de prédisposition génétique gersoise. Serait-il ma madeleine de Proust ? Ou alors, parce qu'un simple bout de gras (contre lequel on s'obstine à se battre, soit dit en passant), s'avère finalement bien plus complexe qu'il n'y paraît. Certes, les grandes découvertes en physiologie sont certainement déjà faites, et pourtant il reste tant de questions sans réponse. Ma première expérience vis-à-vis de ce tissu adipeux consista à essayer de faire différencier ses cellules progénitrices en neurones lors d'un stage de première année de master, peu concluante sur la forme mais le début d'une « histoire d'amour ». S'en sont suivies quatre belles années, de très bons souvenirs dans cette vraie équipe. Je ne pense pas m'être levée une seule fois en me disant que je n'avais pas envie d'aller au labo, même si j'en suis souvent partie en voulant aller me coucher ! Tout cela grâce à de chouettes collègues et une super ambiance de travail. Des chamailleries pour aller manger à des heures descentes. Du chantage pour un gâteau. De nombreuses moqueries (presque toujours infondées). Un surnom tellement simple, mais justifié. Les « boulettes », réalisées une fois, pas deux, et « rattrapées » par un bocal de foie gras (j'aurai pu ruiner mes parents). La première fut de jeter les ARNm après en avoir prélevé une petite quantité pour faire les RT (j'en avais plus besoin...). Lancer le run du 7500 en mode « fast » avec des réactifs « standard ». Exploder une flasque de tissu au sol en cours de digestion vers 19/20h (on est rentré plus tôt que prévu). Toutes les erreurs possibles pour le premier western blot (tampon de migration, membrane...), même si dans l'histoire on était deux. Plus récemment, étudier les effets du chlore sur les tissus adipeux de souris attendues comme le messie pendant un an (mais je maintiens que ce fut un concours de circonstances s'acharnant contre moi). On avait dit qu'il fallait les noter, j'en oublie. Malgré tout ça, une formidable entraide pour les manips, en particulier à l'arrivée des tissus. Toujours quelqu'un sur qui

compter. Toujours quelqu'un pour me rassurer et m'encourager, et pour râler (parce que ça fait du bien). Je tiens à remercier Chloé, ma co-témoin de mariage préférée, que j'ai vu progresser de jour en jour à la « tête au papier de sucre », grâce à la persévérance de Christophe et à ses talents d'entraîneur (et ses récompenses chocolatées). Pauline, la bonne fée du labo, et ton caractère boudeur mais tellement agréable ! Fanny pour m'avoir fait découvrir cette autre culture du « nord » et ses fromages et pour tes conseils d'ancienne thésarde, Alec la cyto-maître toujours de bonne humeur, Max pour vos passionnantes discussions (plus ou moins scientifiques), les connaissances et le point de vue que vous apportez au quotidien. Je remercie particulièrement Anne, pour votre confiance, votre aide et vos conseils si précieux (et votre sens du débat), ce fut un vrai plaisir de travailler dans votre équipe et de partager votre enthousiasme pour toutes les choses géniales que l'on pourrait faire autour du tissu adipeux. Enfin, David et Jean, mes « petit » (je parle de hiérarchie David) et « grand » chef. Merci pour tout ce que vous m'avez appris, votre patience dont j'ai peut-être abusé, et votre soutien sans faille. Ça ne va pas être facile de voler de mes propres ailes ! Chloé : « tu fais quoi Nath ? », « j'attends David », « l'histoire de ta thèse ! ». Ça ne résume pas si mal ces quatre années. David, je ne citerai pas tes nombreux défauts ici (on en a tous), mais qu'est-ce que tu as pu être pénible, à croire que tu prenais un malin plaisir à nous faire attendre. Quoi qu'il en soit, j'ai adoré faire partie de ce « binôme ». Et mon cher Jean, le roi du bricolage et des gadgets (j'espère que tu me tiendras au courant des résultats du « clarity »), ses « nouveaux dadas » (je ne peux pas passer à côté des anciens dadas qui reviennent régulièrement comme le dosage de l'ADN, désolée), les portes jamais claquées, et la joie de relancer les débats ou juste pour embêter Anne (en fin de réunion généralement). Merci pour tout ce que tu as pu faire pour moi (encore désolée pour ton pointeur préféré), merci de m'avoir supporté et amené au bout de cette aventure. Sans oublier les à côté du labo, avec la triplète la plus cool du deuxième étage Etienne, Frédéric, Valentin (vous ne m'avez pas fait l'honneur de venir à la gym suédoise, je ne l'oublierai jamais !), la reine des coupes Lucie (quel bonheur de savoir qu'il y a au moins une personne encore plus pénible que moi pour manger ses fruits), ma dentiste préférée Alexia (oui, il en existe au moins une sympa !), et bien sûr Chloé, David et Fanny.

Au cours de ces trois années de thèse, j'ai eu la chance de participer à de nombreux congrès internationaux, de belles expériences professionnelles et personnelles. De

nombreux souvenirs de congrès, dont trinquer avec Ronald Kahn à Boston ! Mais le regret de ne pas avoir eu le courage de présenter nos résultats à Yu-Hua Tseng, la pro de la BMP7... Une prochaine fois ! Souvenir aussi d'un chercheur éméché pas très fin dont on me rappelle régulièrement l'existence. J'ai eu l'honneur de présenter mes travaux à Barbara Cannon et Jan Nedergaard, les spécialistes de la physiologie du tissu adipeux brun, accompagnée d'une boule au ventre... Un exploit personnel et un beau souvenir. J'étais loin de penser que j'aurai la chance de faire mon premier post-doc dans leur laboratoire. Merci à Valentin (et à tes talents de medium ?) pour m'avoir envoyé cette offre de post-doc par mail ayant pour sujet « ton avenir... ». Où me conduira le tissu adipeux par la suite (si ce n'est vers la nuit et le froid suédois) ?

Merci aussi à mes chers parents, sans qui la réalisation de mes études n'aurait pas été possible. Merci pour votre confiance, et pour les provisions du dimanche soir ! Mais aussi pour ces précieux instants démucois, sans oublier mon frère, ma belle-sœur préférée, Lélé et Gael, même si vous faites trop de bruit le dimanche matin, et tout le reste de ma famille. Un entourage indispensable. Merci également à mes copines gersoises, Alice, Cloé, Claire, Phiphi, Marianne et Willou. Même si nos routes commencent à nous éloigner, c'est toujours un immense plaisir de vous retrouver.

Quatre années magnifiques personnellement aussi. J'ai quand même bien fait d'aller fêter la fin de mes exams de M2 à la Paillotte (une institution auscitaine). Merci pour ta compréhension et ton soutien extraordinaire, même si cela n'a pas été, et n'est pas, facile tous les jours (heureusement que j'ai bon caractère). Un refuge pour oublier les soucis toulousains et partager de merveilleux moments. Des leçons de cinéma, de musique, et de sports, football, rugby, tous les sports diffusés en réalité... De beaux voyages aussi, et ce n'est qu'un début. Environ 32000 km parcourus (oui j'ai calculé) pour te rejoindre pour nos précieux weekends, je n'en regrette pas un seul. Nos quatre premières années, mon Nicolas.

Je pense vraiment avoir eu de la chance (oui David, il faut quand même la provoquer), dès le M2, puis le concours de l'école doctorale, une thèse qui s'est formidablement bien passé malgré des moments difficiles, et finalement un post-doc qui commence dans l'une des deux équipes que je désirais. Tout cela ne serait jamais arrivé sans vous tous, alors du fond du cœur MERCI !

Résumé

Chez les mammifères, deux types de tissus adipeux (TA) sont présents, les TA blanc et brun. Le TA blanc, majoritaire chez l'homme adulte, est composé d'adipocytes spécialisés dans le stockage et la libération des lipides. Le TA brun, présent en très faible quantité chez l'adulte, est spécialisé dans la régulation de la thermogenèse grâce à l'expression de la protéine découplante mitochondriale UCP1. Récemment, les adipocytes « beiges » ont été identifiés dans les TA blancs chez la souris après une exposition au froid. Ils possèdent des caractéristiques des adipocytes bruns et améliorent les paramètres métaboliques. Augmenter la présence de ces adipocytes constitue une cible thérapeutique pour lutter contre les pathologies associées à l'obésité.

Chez l'homme, l'obésité se caractérise par une expansion des TA blancs qui se fait par hypertrophie adipocytaire puis, par hyperplasie adipocytaire via le processus d'adipogenèse. L'adipogenèse correspond à l'engagement des cellules progénitrices des TA blancs en préadipocytes, suivi de la différenciation en adipocytes. Un défaut d'adipogenèse pourrait limiter les capacités de stockage des TA, conduisant à la formation de dépôts lipidiques toxiques dans le foie ou les muscles, et contribuer au développement des pathologies associées à l'obésité. Bien que les cellules progénitrices soient caractérisées par l'expression du CD34 et l'absence du CD31, le préadipocyte humain n'est toujours pas identifié. Les marqueurs du préadipocyte murin ne sont pas, pour la plupart, relevant chez l'homme. De plus, les signaux endogènes régulant l'adipogenèse sont peu connus chez l'homme. Les BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) appartiennent à la famille du TGF β et contrôlent de nombreux processus lors du développement embryonnaire et chez l'adulte. Chez la souris, les BMP2/BMP4 et la BMP7 induisent l'engagement dans la voie adipocytaire blanche et brune respectivement. Peu de données sont disponibles concernant leurs rôles dans l'adipogenèse humaine et leurs productions dans le TA. Cette thèse a donc pour objectifs de caractériser le préadipocyte humain et d'évaluer le rôle des BMPs dans l'adipogenèse.

Nous avons étudié l'hétérogénéité des cellules progénitrices CD34⁺/CD31⁻ dans les TA blancs humains sur la base de l'expression de deux marqueurs de surface, MSCA1 (ou TNAP, tissue non

specific alkaline phosphatase) et CD271 (ou NGFR, nerve growth factor receptor). Ainsi, la population progénitrice du TA peut être divisée en trois sous-types : les CD271+/MSCA1+, les CD271+/MSCA1- et les CD271-/MSCA1-. La quantité de cellules CD271+/MSCA1+ varie en fonction des localisations anatomiques et de l'état d'obésité des individus. MSCA1, ainsi que son activité enzymatique, sont induits au cours de l'adipogenèse et nécessaires à ce processus. La population CD271+/MSCA1+ présente des caractéristiques des cellules les plus engagées dans les voies adipocytaires blanche et beige. Les cellules immunes du TA répriment la différenciation adipocytaire blanche et beige en inhibant l'expression et l'activité de MSCA1. De plus, les cellules progénitrices CD271-/MSCA1- expriment la BMP7 qui est capable d'induire l'adipogenèse blanche et beige en augmentant l'expression et l'activité de MSCA1. Par ailleurs, l'expression de la BMP7 dans les cellules progénitrices augmente avec l'adiposité. Enfin, les BMP2 et BMP4 ne sont ni exprimées spécifiquement par un type cellulaire du TA ni modulées par l'indice de masse corporelle. Ces deux BMPs augmentent la différenciation blanche indépendamment de MSCA1 et sont sans effet sur la différenciation beige.

Nous avons donc montré que le préadipocyte natif humain est caractérisé par l'expression de MSCA1 et possède un potentiel de différenciation blanche et beige. Les modifications du microenvironnement induites avec l'obésité, dont les cellules immunes et la BMP7, modulent l'adipogenèse blanche et beige en partie via la régulation de l'expression et de l'activité de MSCA1.

Abstract

In mammals, two types of adipose tissue (AT) are described, the white and the brown AT. The white AT, main fat depot in adult human, is composed of adipocytes specialized in lipid storage and release. The brown AT, present in very low amount in adult, is specialized in thermogenesis through the expression of the mitochondrial uncoupling protein UCP1. Recently, brite adipocytes were identified in mice in classical white fat depot particularly after cold exposure. Brite adipocytes exhibit brown adipocyte characteristics such as UCP1 expression and were shown to improve metabolic parameters. Promoting brite adipocytes is considered as a therapeutic strategy to fight against obesity-associated pathologies.

In human, obesity is characterized by an expansion of white AT depots due to adipocyte hypertrophy and hyperplasia through the process of adipogenesis. Adipogenesis corresponds to the commitment of white AT progenitor cells into preadipocytes followed by the differentiation into adipocytes. Defect in adipogenesis process will limit AT storage capacities, leading to the formation of ectopic and toxic fat depots in liver and muscles and will promote the development of obesity-associated pathologies. Although adult human AT progenitor cells are characterized by the expression of CD34 and lack of CD31, human preadipocyte remains to be identified. Most of the murine preadipocyte markers are not relevant in human. Moreover, endogenous signals regulating human adipogenesis are largely unknown. Bone morphogenetic proteins (BMPs) are members of the TGF β superfamily involved in numerous processes during embryonic development and in adult. In mice, BMP2/BMP4 and BMP7 induce the commitment in white and brown lineages respectively. Little is known about the role of BMPs in human adipogenesis, as well as about their tissue expression. The present work aimed to characterize the human preadipocyte and to evaluate the role of BMPs in the regulation of adipogenesis.

We studied the heterogeneity of CD34⁺/CD31⁻ progenitor cells in human white AT according to two cell surface marker expression, MSCA1 (or TNAP, tissue non specific alkaline phosphatase) and CD271 (or NGFR, nerve growth factor receptor). We showed that the progenitor cell population could be divided into three cell subsets: CD271⁺/MSCA1⁺, CD271⁺/MSCA1⁻ and CD271⁻/MSCA1⁻. The CD271⁺/MSCA1⁺ cell subset was modulated according to AT anatomical

locations (subcutaneous and visceral AT) and adiposity degree. The expression of MSCA1 and its enzymatic activity were induced during adipogenesis and necessary for adipogenesis. The CD271⁺/MSCA1⁺ population exhibited characteristics of white and brite committed cells. Finally, we demonstrated that AT microenvironment, including immune cells and BMP7, modulated white and brite differentiation through the regulation of MSCA1 expression and activity. The expression of BMP7 was restricted to the CD271⁻/MSCA1⁻ progenitor cell subset and increased with adiposity degree. Concerning BMP2 and BMP4, neither cell specific expression nor impact of obesity was observed. However, both enhanced white adipogenesis independently of MSCA1 and without affecting brite adipogenesis.

In conclusion, the present work shows that the human native AT preadipocyte is characterized by MSCA1 expression and exhibits both white and brite adipogenic potentials. Changes in AT microenvironment according to obesity degree, including BMP7 as well as immune cells, modulate white and brite adipogenesis, in part through the regulation of MSCA1 expression and activity.

Liste des abréviations :

18-FDG : 18-fluorodeoxyglucose

AC : adénylyl-cyclase

ACS : acyl CoA synthase

ACVRs : activin type 1 receptors

ADD1 : adipocyte differentiation and determination factor 1

ADN : acide désoxyribonucléique

AG : acide gras

ALKs : activin receptor-like kinase

AMP / AMPc : adenosine monophosphate / adenosine monophosphate cyclique

ANP : atrial natriuretic peptide

aP2 : adipocyte protein 2, ou FABP4

AQP-7 : aquaporine 7

ATF2 : activating transcription factor 2

ATGL : adipose triglyceride lipase

ATP : adénosine triphosphate

BAMBI : BMP and activin membrane-bound inhibitor

BMPR : bone morphogenetic protein receptor

BMPs : bone morphogenetic proteins

BNP : brain natriuretic peptide

C/EBPs : CCAAT enhancer binding proteins

CD137 ou TNFRSF9 : tumor necrosis factor receptor superfamily member 9

CD24/CD29/CD90 : cluster of differentiation

CD31 ou PECAM-1 : platelet endothelial cell adhesion molecule

CD34 : cluster of differentiation 34, sialomucin

CD45 ou PTPRC : receptor-type tyrosine-protein phosphatase C

CHOP : C/EBP homologous protein

ChREBP : carbohydrate-responsive element-binding protein

CIDEA : cell death-inducing DFFA-like effector A

CITED1 : Cbp/P300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain 1

CPT1 : carnitine palmitoyltransferase

CREB : cAMP regulatory element-binding protein

Ctrl : contrôle

Dio2 : iodothyronine désiodase de type 2

Ebf3 : early B cell factor 3

ELOVL3 : elongation of very long chain fatty acids protein 3

ERK : extracellular signal-regulated kinase

Eva1 : epithelial V-like antigen 1

EWS : ewing sarcoma

FABPs : fatty acid binding proteins

FACS : fluorescence-activated cell sorting

FADH : flavine adénine dinucléotide

FAS : fatty acid synthase

FAT : fatty acid translocase

FATPs : fatty acid transport proteins

FGF21 : fibroblast growth factor-21

FOP : fibrodysplasie ossifiante progressive

FSV : fraction stroma-vasculaire

G3P : glycerol-3-phosphate

GATAs : GATA-binding proteins

GDFs : growth differentiation factors

GFP : green fluorescent protein

GLUT : glucose transporteur

GPAT : glycerol phosphate acyltransferase

GPDH : glycerol-3-phosphate déshydrogénase

HAP : hypertension artérielle pulmonaire

hMADS : human multipotent adipose-derived stem cells

HOMA-IR : homeostatic model assessment insulin resistance

IBMX : isobutylmethylxanthine

IGF-1 : insulin like growth factor-1

IL : interleukine

IMC : indice de masse corporelle

JNK : c-Jun N-terminal kinase

KLFs : krüppel-like factors

KO : knock-out

Krox20 ou Egr2 : early growth response gene 2

LHS : lipase hormone-sensible

Lin : lineage

Lox : lysyloxidase

LPL : lipoprotéine lipase

LXR α / β : liver X receptor α / β

Mac1 : macrophage-1 antigen

MAPK : mitogen-activated protein kinase

MFI : mean fluorescence activity

MH1 / 2 : MAD homology domain 1 / 2

MSCA1 : mesenchymal stem cell antigen 1

Myf5 : myogenic factor 5

NADH : nicotinamide adénine dinucléotide

NGFR : nerve growth factor receptor

NPR-A : natriuretic peptide receptor A

OP-1 : osteogenic protein 1

PBX1 : pre-B-cell leukemia transcription factor

PDGFR α / β : platelet-derived growth factor receptor α / β

PET-CT : positron emission tomography – computed tomography

PGC1 α : PPAR γ coactivator 1 α

PKA : protein kinase A

PLIN1 : périlipine 1

POMC : pro-opiomélanocortine

PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptor

PPRE : PPAR response elements

pRB : retinoblastoma protein

PRDM16 : PRD1-BF1-RIZ1 homologous domain containing 16

Pref-1 : preadipocyte factor-1, ou Dlk-1 : protein delta homolog 1

RIP140 : receptor-interacting protein 140

RLUs : relative luminescence units

RNAi : ribonucleic acid interference

RNF12 : E3 ubiquitin-protein ligase RLIM

RT-qPCR : reverse transcription polymerase chain reaction

RXRs : retinoid X receptors

SBE : smad-binding domain

SC : sous-cutané

Sca-1 : stem cell antigen-1

SGBS : simpson golabi-behmel syndrome

Shn2 : schnurri-2

shRNA : short hairpin ribonucleic acid

Smad : small mother against decapentaplegic

Smurf1 / 2 : SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1 / 2

SPJ : syndrome de polypose juvenile

SREBP1c : sterol regulatory element binding protein 1c

STATs : active signal transducer and activator of transcription

T3 : triiodothyronine

T4 : thyroxine

TA : tissu adipeux

TAB1 : TAK binding protein

TAK1 : TGF- β activated kinase 1

TG : triglyceride

TGF- β : transforming growth factor β

Tie2 : tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains

Tmem26 : transmembrane protein 26

TNAP : tissue non-specific alkaline phosphatase

TNF α : tumor necrosis factor α

Tsg : twisted gastrulation

UBE20 : ubiquitine-conjugating enzyme E20

UCP1 : uncoupling protein 1

VE-cadhérine : vascular endothelial cadherin

VEGF-A : vascular endothelial growth factor A

VISC : viscéral

VLDL : very low density lipoprotein

WISP2 : WNT1 inducible signaling pathway protein 2

WNT : wingless type

YBX1 : Y-box binding protein 1

ZFPs : zinc finger proteins

Zic1 : zinc finger protein 1

α MSH : α -melanocyte-stimulating hormone

β 1/2-AR : β 1/2 adrenergic receptor

Sommaire

Introduction	1
I) Les différents types de tissus adipeux.....	1
1) Le tissu adipeux blanc.....	1
a) Principales fonctions de l'adipocyte blanc	2
La lipogenèse	3
La lipolyse	3
Sécrétions adipocytaires	4
b) Expansion des dépôts adipeux blancs et conséquences métaboliques selon leur localisation	4
2) Le tissu adipeux brun.....	7
a) Principales fonctions	7
La thermogenèse	7
Sécrétions adipocytaires	8
b) Localisations anatomiques du tissu adipeux brun chez l'adulte et rôles physiologiques	9
3) Les adipocytes brites	10
4) Les « pink adipocytes ».....	111
II) L'adipogenèse.....	12
1) Les progéniteurs adipocytaires	133
a) Les progéniteurs adipocytaires blancs	133
b) Les progéniteurs adipocytaires bruns	155
c) Les progéniteurs adipocytaires brites	166
2) Modèles cellulaires d'étude de l'adipogenèse	166
a) Les principales lignées cellulaires murines.....	17
b) Lignées cellulaires humaines	18
c) Les cellules primaires.....	199
d) Protocoles d'adipogenèse <i>in vitro</i>	20
3) Les étapes de l'adipogenèse.....	20
4) Les mécanismes moléculaires de l'adipogenèse	211
a) Les facteurs de transcription de l'engagement adipocytaire	222
b) Les facteurs de transcription de la différenciation terminale	233
c) Régulation de l'adipogenèse par le microenvironnement	288

Revue : « L'adipogenèse des tissus adipeux blancs : influence du microenvironnement »	299
III) Les Bone Morphogenetic Proteins (BMPs).....	30
1) Les BMPs.....	30
a) Synthèse des BMPs.....	31
b) Récepteurs et voies de signalisation (figure 16)	32
c) Modulations extra- et intracellulaires de la signalisation des BMPs.....	33
d) Sites de production.....	34
2) Les BMPs et tissus adipeux.....	35
a) BMP2, BMP4 et BMP7 et adipogenèse	35
BMP2 et BMP4	35
BMP7	36
b) Autres BMPs et adipogenèse	37
c) Autres membres de la superfamille du TGF- β et adipogenèse	37
Activine A.....	38
TGF- β	38
Myostatine	39
Follistatine	39
d) BMPs et métabolisme énergétique	39
Les récepteurs aux BMPs.....	40
BMP4	40
BMP7	41
GDF5 (BMP14)	41
BMP8b	42
e) BMPs et obésité chez l'homme	42
Objectifs.....	444
Résultats	46
<u>Première partie</u> : capacités adipogéniques des cellules progénitrices humaines CD34+/CD31- originaires des TA sous-cutanés abdominaux superficiel et profond.	48
Article : « Cellular heterogeneity in superficial and deep subcutaneous adipose tissues in overweight patients ».....	49
<u>Deuxième partie</u> : capacités adipogéniques des cellules progénitrices humaines CD34+/CD31- originaires des TA sous-cutané abdominal et viscéral.	50

<u>Troisième partie</u> : identification d'un marqueur du préadipocyte humain et caractérisation des potentiels adipogéniques du préadipocyte.....	51
Article : « Human white and brite adipogenesis is supported by MSCA1 and is impaired by immune cells »	53
<u>Quatrième partie</u> : expression génique de BMP7 dans le TA sous-cutané abdominal en fonction de l'obésité et dans les TA sous-cutané abdominal et viscéral chez l'obèse.	54
<u>Cinquième partie</u> : rôles des BMP2 et BMP4 sur l'adipogenèse humaine et leur relevance physiologique.	566
Introduction.....	56
Matériels et méthodes	57
Résultats et discussion	58
Discussion-perspectives	64
Références bibliographiques	76

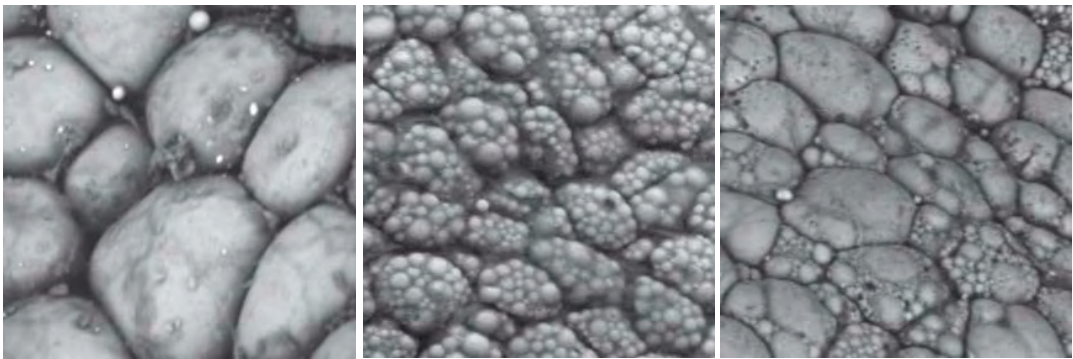


Figure 1 : Les différents types d'adipocytes

Images de microscopie électronique des différents adipocytes murins. Adipocytes blancs uniloculaires du TA sous-cutané inguinal (gauche), adipocytes bruns multiloculaires du TA scapulaire (milieu), adipocytes bruns multiloculaires dans le TA blanc sous-cutané inguinal après stimulation β_3 -adrénergique (droite).

Adapté de Bartelt and Heeren, 2014

Introduction

I) Les différents types de tissus adipeux

Deux grands types de tissus adipeux (TA) sont présents chez les mammifères, le TA blanc et le TA brun, possédant des fonctions spécifiques. Bien que le TA blanc soit aujourd'hui davantage perçu comme un organe de stockage, la fonction principale de ce tissu est la libération des acides gras en conditions de jeûne ou d'exercice physique. Le TA brun quant à lui est spécialisé dans la production de chaleur. Le développement embryonnaire de ces TA est différent chez l'homme et chez la souris. Chez l'homme, le TA blanc commence à se développer dès le deuxième trimestre de grossesse et peut s'accroître après la naissance et tout au long de la vie de l'individu. Le TA brun apparaît avant le TA blanc, il est bien développé au deuxième trimestre de grossesse et atteint sa taille maximale à la naissance. Il a longtemps été admis que le TA brun disparaissait chez l'adulte, nous verrons par la suite qu'il régresse avec l'âge. Chez la souris, le TA blanc apparaît peu de temps avant la naissance, voire après la naissance pour la localisation péri-gonadique. Le TA brun apparaît au 15^e jour du développement embryonnaire et continue à se développer à la naissance. Contrairement à l'homme, la fonctionnalité du TA brun persiste tout au long de la vie de l'animal.

Récemment, un nouveau type d'adipocyte, les adipocytes brites (« brown in white » (Petrovic et al., 2010), pour les européens) ou beiges (Ishibashi and Seale, 2010) (pour les américains) a été décrit chez la souris. Ces adipocytes se trouvent au sein du TA blanc inguinal mais possèdent des caractéristiques des adipocytes bruns (figure 1 (Bartelt and Heeren, 2014)).

1) Le tissu adipeux blanc

Le TA blanc fut longtemps considéré comme un tissu conjonctif sous-cutané ayant un rôle d'isolant thermique et comme un lieu de stockage des lipides où ils sont puisés selon les apports nutritionnels et les besoins énergétiques de l'organisme. Dans les années 1970, le rôle du TA

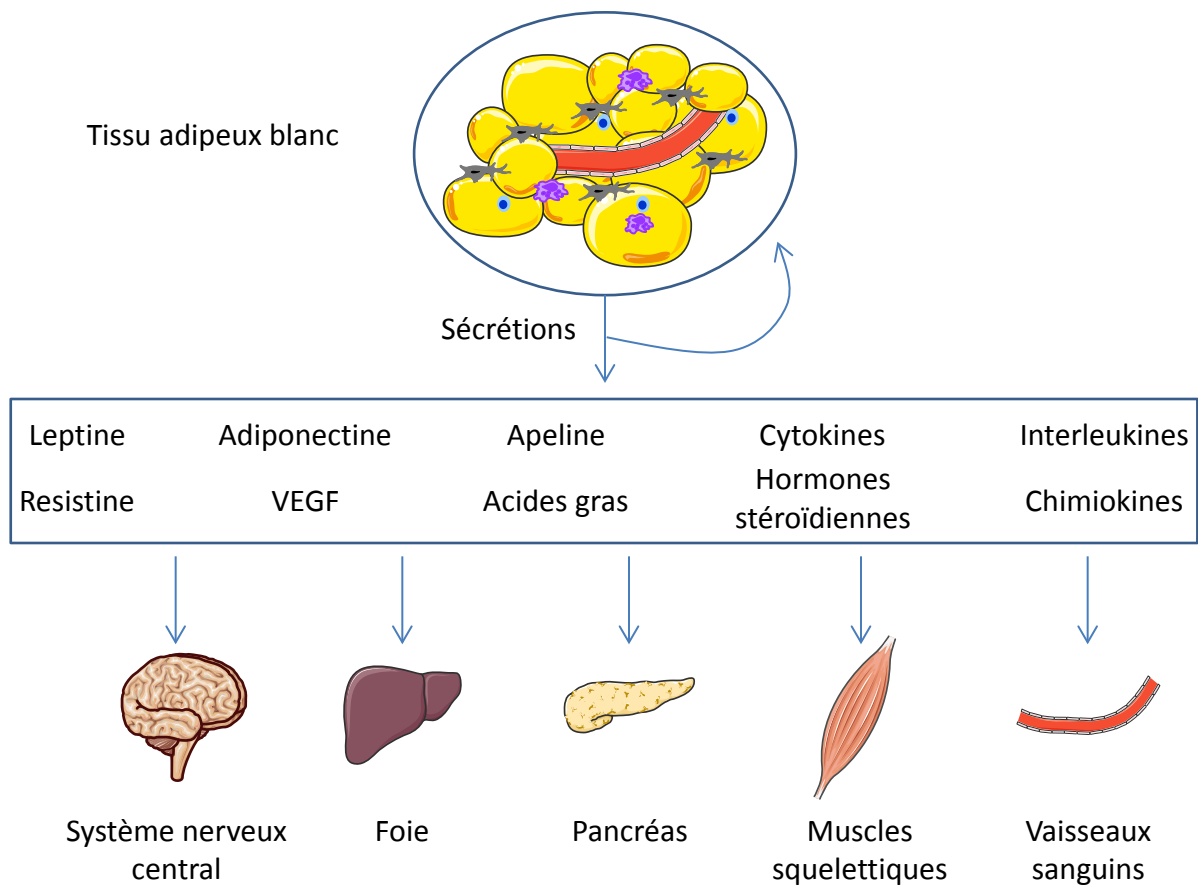


Figure 2 : Principales sécrétions du tissu adipeux blanc et leurs organes cibles

Le TA blanc sécrète un grand nombre de molécules, appelées adipokines, qui agissent à la fois de façon autocrine/paracrine mais aussi de façon endocrine via la circulation sanguine. Ces adipokines modulent plusieurs mécanismes comme le contrôle de la prise alimentaire, la réponse à l'insuline dans divers organes tels que le foie, le pancréas et les muscles squelettiques, ou la fonctionnalité vasculaire.

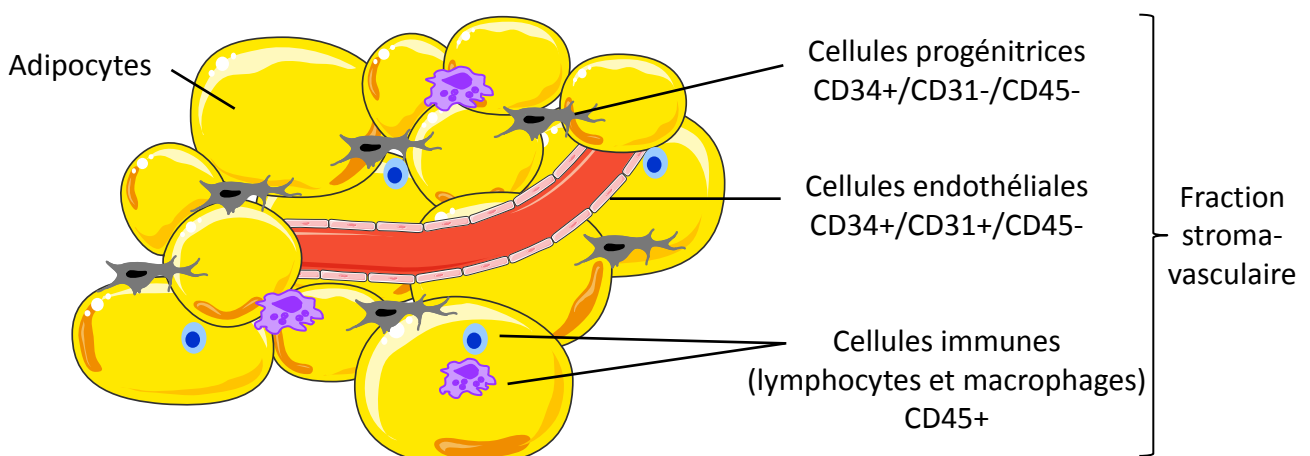


Figure 3 : Composition cellulaire du tissu adipeux blanc chez l'homme

Le TA humain est composé d'adipocytes matures et de la fraction stroma-vasculaire, contenant elle-même les cellules progénitrices (caractérisées par l'expression de CD34 et l'absence de CD31 et de CD45), les cellules endothéliales (caractérisées par l'expression de CD34 et de CD31 et l'absence d'expression de CD45) et des cellules immunes (lymphocytes et macrophages, caractérisés par l'expression de CD45).

dans le métabolisme des stéroïdes sexuels a été mis en évidence (Nimrod and Ryan, 1975). Enfin, la découverte en 1994 de la production et sécrétion d'une hormone par le TA, la leptine, emporta la conviction sur sa fonction d'organe endocrine (Zhang et al., 1994). En effet, il est maintenant bien connu que le TA est non seulement capable de percevoir des signaux hormonaux et nerveux mais aussi qu'il sécrète de nombreuses molécules, appelées adipokines. Ces dernières peuvent agir aux niveaux local et systémique et régulent notamment la prise alimentaire et la réponse à l'insuline (figure 2). Le TA blanc apparait alors comme un véritable acteur de la régulation du métabolisme énergétique. En effet, l'excès de TA (obésité) comme le déficit de TA (lipodystrophie) sont associés à de nombreuses pathologies métaboliques ayant en commun le stockage ectopique de lipides dans le foie, le pancréas ou les muscles squelettiques (Petersen et al., 2002; Samuel and Shulman, 2012).

Le TA blanc chez l'homme est composé des adipocytes et de la fraction non-adipocytaire, aussi appelée fraction stroma-vasculaire (FSV). La FSV contient des cellules progénitrices, des cellules endothéliales et des cellules immunes (macrophages et lymphocytes) (figure 3). L'adipocyte blanc est la cellule spécialisée dans le stockage et la libération des lipides, impliquée dans la régulation du métabolisme énergétique via ses capacités de lipogenèse, de lipolyse et de sécrétion. Cette cellule spécialisée se caractérise par une vacuole lipidique unique qui occupe la majorité du cytoplasme. La gouttelette lipidique est entourée de nombreuses protéines qui régulent l'incorporation et la libération des acides gras par la gouttelette dont la périlipine (Fujimoto and Parton, 2011).

a) Principales fonctions de l'adipocyte blanc

Les activités métaboliques de l'adipocyte blanc sont la lipogenèse (stockage des acides gras sous forme de triglycérides neutres) et la lipolyse (hydrolyse des triglycérides) (figure 4).

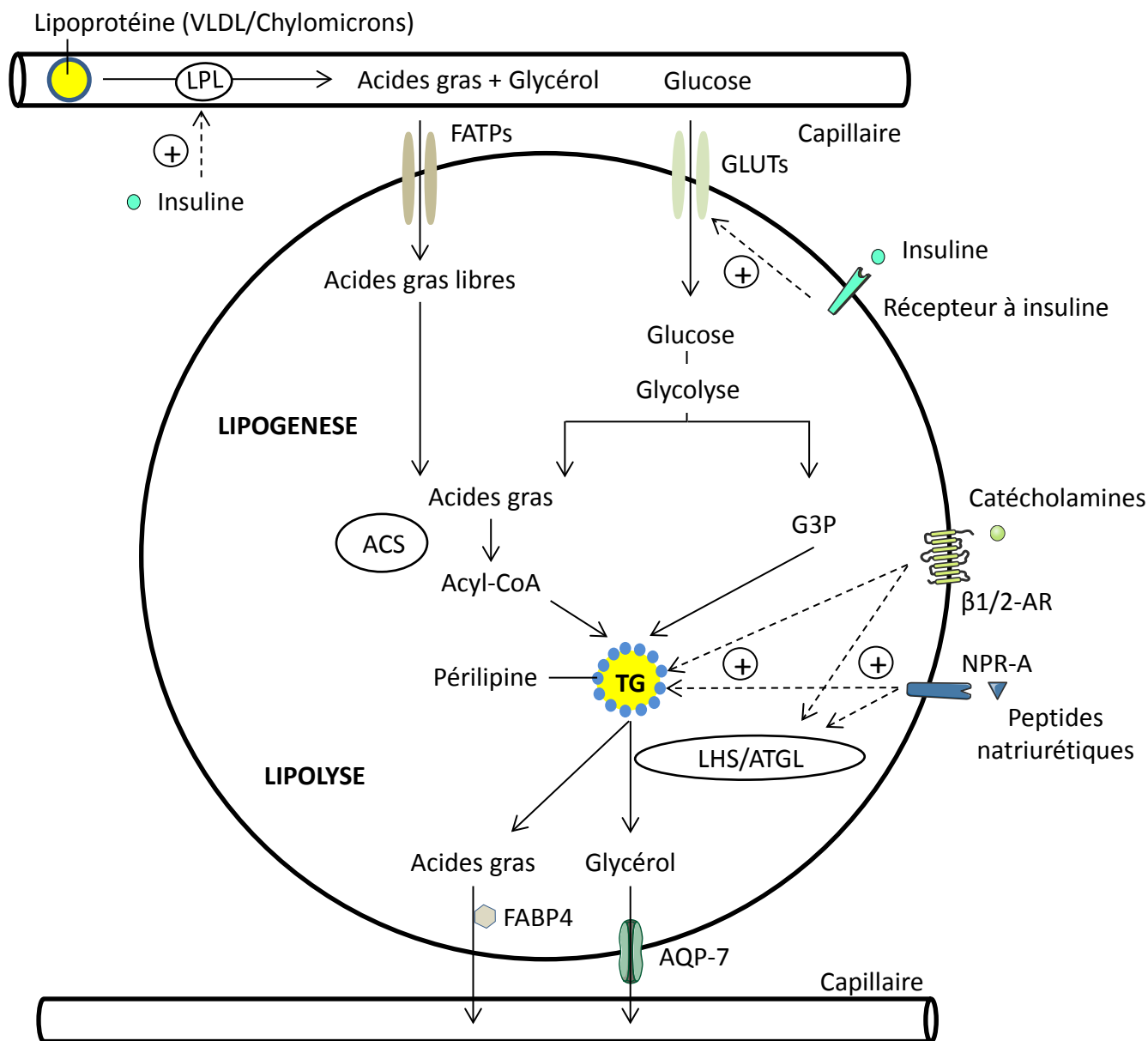


Figure 4 : Lipogénèse et lipolyse dans l'adipocyte blanc humain

La lipogénèse est stimulée par l'insuline et conduit à la transformation et au stockage des acides gras en triglycérides. L'insuline augmente l'activité de la lipoprotéine lipase (LPL) de l'endothélium et stimule l'entrée du glucose dans l'adipocyte via les transporteurs GLUT1/4. La LPL hydrolyse les acides gras de la circulation sanguine contenus dans les lipoprotéines (chylomicrons ou VLDL, Very Low Density Lipoprotein) et conduit à la libération des acides gras et du glycérol. Ces acides gras libres entrent dans l'adipocytes via les FATPs (fatty acid transport proteins) et sont ensuite convertis en Acyl-CoA par l'acyl-CoA synthase (ACS). L'hydrolyse du glucose, ou glycolyse, permet également la formation d'acyl-CoA et de glycérol-3-phosphate (G3P). L'acyl-CoA et le G3P permettent la formation des triglycérides (TG) via l'action de plusieurs enzymes, la glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT), la sn-1-acylglycérol-3-phosphate acyltransférase (AGPAT), la phosphohydrolase de l'acide phosphatidique (PAP) et la diacylglycérol acyltransférase (DGAT).

La lipolyse est stimulée par les catécholamines (adrénaline et noradrénaline) et les peptides natriurétiques (ANP atrial natriuretic peptide et BNP brain natriuretic peptide). Les signalisations de ces ligands conduisent à l'activation de la LHS (lipase hormono-sensible) et à la phosphorylation de la périlipine (protéine de la gouttelette lipidique). La phosphorylation de la périlipine modifie la structure de la gouttelette lipidique et facilite l'action des lipases, et permet également d'activer l'ATGL (adipose triglycerides lipase). Les acides gras et le glycérol sont libérés de l'adipocyte via FABP4 et l'aquaporine 7 (AQP-7) respectivement.

$\beta 1/2$ -AR : récepteurs $\beta 1/2$ -adrénergiques, NPR-A : récepteur peptide natriurétique de type A.

La lipogenèse

Chez l'homme, la lipogenèse, principalement stimulée par l'insuline, peut provenir des triglycérides circulants ou bien de substrats non lipidiques tel que le glucose, on parle alors de lipogenèse *de novo*. Cependant, la lipogenèse *de novo* semble être faiblement active dans l'adipocyte humain (Letexier et al., 2003). Les triglycérides liés à leur protéine de transport (VLDL, very low density lipoproteins, ou chylomicrons) de la circulation sanguine sont hydrolysés au niveau de l'endothélium par la lipoprotéine lipase (LPL). Le transport des acides gras non-estérifiés dans l'adipocyte est facilité par les FATPs (fatty acid transport proteins) et les FABPs (fatty acid binding proteins). Les acides gras sont ensuite convertis en l'acyl-CoA par l'acyl-CoA synthase (Lafontan, 2008). Le glucose est transporté par le transporteur constitutif GLUT1 et le transporteur régulé par l'insuline GLUT4. L'hydrolyse du glucose permet la formation de glycérol-3-phosphate (G3P), utilisé pour former le squelette carboné des triglycérides, et d'acyl-CoA. L'acyl-CoA et le G3P permettent la formation des triglycérides qui sont incorporés dans la gouttelette lipidique.

La lipolyse

La lipolyse peut être stimulée par les peptides natriurétiques (Sengenès et al., 2000) (ANP atrial natriuretic peptide et BNP brain natriuretic peptide) via le récepteur NPR-A (natriuretic peptide receptor A) et par les catécholamines (adrénaline et noradrénaline) via leurs récepteurs β 1/2-adrénériques. Elle est inhibée par les récepteurs α 2-adrénériques ainsi que par l'insuline. L'activation des récepteurs aux peptides natriurétiques ou β -adrénériques conduit à la phosphorylation de la protéine de la gouttelette lipidique la périlipine et de la lipase hormonosensible (LHS), ce qui facilite l'action de l'ATGL (adipose triglyceride lipase) et de la LHS. Ces enzymes hydrolysent les triglycérides, formant des diglycérides. Ces derniers sont à leur tour hydrolysés par la LHS en monoglycérides. Enfin, les monoglycérides sont hydrolysés par la monoglycéride lipase qui forme les acides gras et le glycérol, libérés par l'adipocyte (Lafontan, 2008). Il est à noter que les récepteurs β -adrénériques diffèrent entre l'homme et la souris (Harms and Seale, 2013). En effet, le récepteur β 3-adrénérique est faiblement exprimé par

l'adipocyte humain et ne possède pas ou peu d'activité (Tavernier et al., 1996; Carpene et al., 1999).

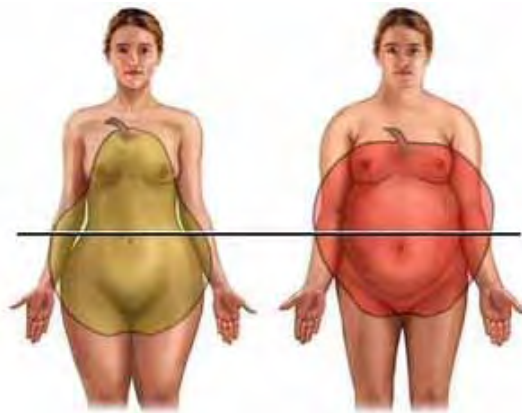
Sécrétions adipocytaires

Les principales adipokines sécrétées spécifiquement par les adipocytes sont la leptine et l'adiponectine. La leptine est une hormone de la satiété qui agit au niveau du système nerveux central et inhibe la prise alimentaire. Elle est produite par les adipocytes, proportionnellement à leur diamètre (Rajala and Scherer, 2003). Les mutations du gène de la leptine ou de son récepteur sont les principales causes d'obésité génétique chez l'homme (O'Rahilly et al., 2003). La leptine a également d'autres effets et possède notamment un effet pro-angiogénique sur les cellules endothéliales (Bouloumie et al., 1998). L'adiponectine est produite par les adipocytes et possède des effets anti-diabétiques (Yamauchi and Kadowaki, 2013). Récemment, un agoniste pharmacologique de l'adiponectine a été développé et semble prometteur dans le traitement des pathologies associées à l'obésité telle que le diabète de type 2 (Okada-Iwabu et al., 2013). Le TA produit également de nombreuses cytokines pro-inflammatoires qui diminuent la sensibilité à l'insuline localement. Les adipocytes, proportionnellement à leur taille, produisent plusieurs cytokines pro-inflammatoires qui recrutent ensuite les cellules immunes. Ainsi, une accumulation de macrophages et de lymphocytes dans le TA a été montrée avec l'obésité, augmentant d'autant plus l'expression des cytokines inflammatoires (Duffaut et al., 2009; Duffaut et al., 2009).

b) Expansion des dépôts adipeux blancs et conséquences métaboliques selon leur localisation

Le TA blanc se trouve dans plusieurs localisations anatomiques, sous-cutanées et viscérales (figure 5). Parmi les localisations sous-cutanées, le TA blanc est présent au niveau abdominal et glutéo-fémoral. Il existe plusieurs dépôts adipeux viscéraux, dont les TA mésentérique et omental. Les adipocytes des différentes localisations ne possèdent pas les mêmes activités

Obésité gynoïde



Obésité androïde

TA glutéo-
fémoral



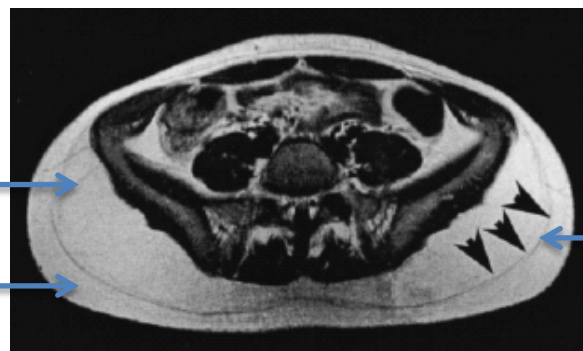
TA sous-cutané

TA viscéral

*Image IRM, U.S. National Library of Medicine
The Visible Human Project*

TA sous-cutané
profond

TA sous-cutané
superficiel



Aponévrose

*Image IRM
Adapté de Smith et al., 2001*

Figure 5 : Obésité gynoïde et androïde et localisations des tissus adipeux

métaboliques et ne sécrètent pas les mêmes adipokines. De fait, en fonction de la localisation du TA, son expansion peut être délétère ou plutôt bénéfique vis-à-vis des complications métaboliques associées à l'obésité.

La femme développe plutôt une obésité dite gynoïde (forme de « poire »), avec le développement du TA glutéo-fémoral. Les adipocytes de ce TA possèdent davantage de récepteurs $\alpha 2$ -adrénergiques que de β -adrénergiques et répondent faiblement aux signaux de mobilisation des lipides. Ainsi, le TA glutéo-fémoral stocke les acides gras à long terme et est considéré comme protecteur (Manolopoulos et al., 2010, 2012). A l'inverse, l'homme développe une obésité dite androïde (forme de « pomme ») avec le développement du TA viscéral (principalement l'omental et le mésentérique). Ce tissu est plus actif métaboliquement que le tissu glutéo-fémoral (plus de récepteurs β - que d' $\alpha 2$ -adrénergiques) et libère directement les acides gras libres dans la veine porte, facilitant ainsi le stockage des lipides dans le foie (Bjorntorp, 1990). Plusieurs études ont montré que la quantité de TA viscéral est positivement corrélée aux risques de complications métaboliques : maladies cardio-vasculaires, résistance à l'insuline, diabète de type 2, etc (Masuzaki et al., 2001). Les sécrétions adipocytaires diffèrent dans les TA sous-cutanés et viscéraux. Parmi les nombreuses cytokines pro-inflammatoires produites par le TA, l'interleukine 6 est davantage sécrétée par le TA viscéral que sous-cutané, et d'autant plus avec l'obésité (Fain et al., 2004). En accord avec une taille adipocytaire plus élevée dans le TA sous-cutané abdominal que viscéral (omental), la sécrétion de leptine par le TA sous-cutané est plus importante que par le TA viscéral (Van Harmelen et al., 1998). La sécrétion d'adiponectine par le TA sous-cutané abdominal est également plus importante que par le TA viscéral mais diminue avec l'obésité (Kovacova et al., 2012). Cependant, le bénéfice ou le risque apporté par l'extension du TA sous-cutané abdominal en termes de complications métaboliques et cardio-vasculaires est controversé (Abate et al., 1996; Ross et al., 1996; Tran et al., 2008). Des études récentes montrent que le TA sous-cutané abdominal peut être divisé en deux parties selon leur localisation par rapport à l'aponévrose. Le TA sous-cutané abdominal superficiel (entre la peau et l'aponévrose) semble plutôt protecteur alors que le profond (sous l'aponévrose) semble délétère (Smith et al., 2001). En effet, sa quantité est positivement corrélée à l'insulino-résistance et aux dysfonctions hépatiques (Kelley et al., 2000; Tordjman et

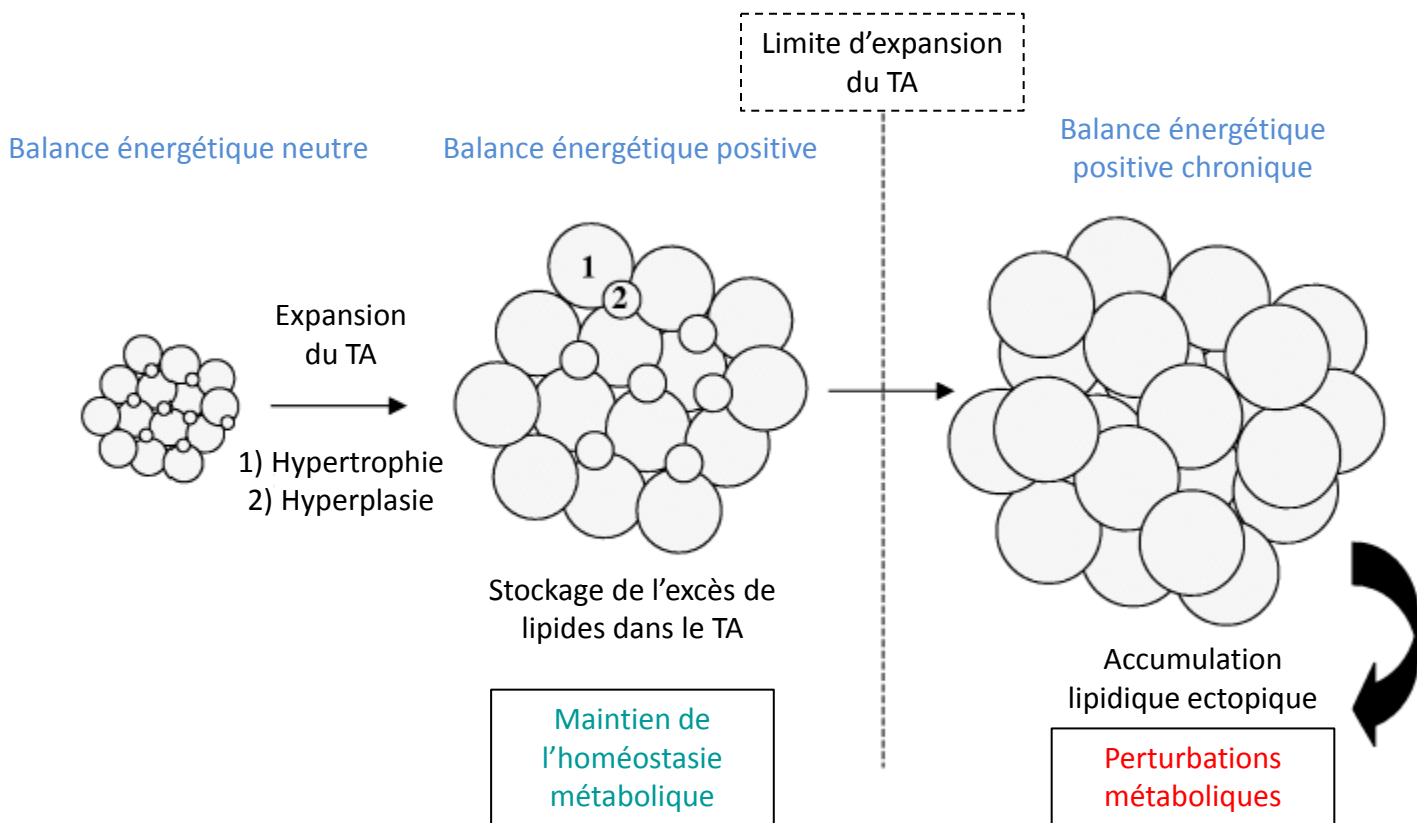


Figure 6 : concept d'expandabilité du tissu adipeux

Lors d'apports énergétiques excessifs, le TA s'accroît dans un premier temps par hypertrophie (augmentation du volume des adipocytes) puis dans un deuxième temps par hyperplasie adipocytaire (augmentation du nombre d'adipocytes). Cependant lors d'un excès énergétique chronique, le TA atteint ses capacités limites de stockage des acides gras. Ils sont alors stockés dans le foie, le pancréas ou les muscles squelettiques. Ces dépôts adipeux ectopiques exercent des effets lipotoxiques et conduisent à des perturbations métaboliques.

Adapté de Gray and Vidal-Puig, 2007

al., 2012). Les adipocytes du TA sous-cutané profond sont plus petits (Boulet et al., 2013) et possèdent une plus grande activité lipolytique que ceux du TA sous-cutané superficiel (Monzon et al., 2002).

Ces dernières années, le concept de limite d'expansion du TA a émergé et suggère que les pathologies associées à l'obésité surviennent lorsque les TA blancs ne sont plus en mesure de stocker l'excès de lipides (Galgani et al., 2008) (figure 6 (Gray and Vidal-Puig, 2007)). Lorsque la balance énergétique (différence entre les apports et la dépense énergétiques) est en faveur des apports, le volume du TA blanc augmente pour permettre le stockage de l'énergie sous forme de lipides. Les lipides stockés dans les adipocytes, sous forme de triglycérides, n'exercent aucun effet toxique pour l'organisme, on considère ainsi que le TA a une fonction de « tampon ». Le TA se développe dans un premier temps par hypertrophie adipocytaire, c'est-à-dire une augmentation du volume des adipocytes, qui permet ainsi d'augmenter leurs capacités de stockage. Lorsque les adipocytes ont atteint un volume limite, une phase d'hyperplasie se met en place conduisant à une augmentation du nombre d'adipocytes (Hirsch and Batchelor, 1976; Wang et al., 2013). Le recrutement de ces nouveaux adipocytes se fait par le processus d'adipogenèse, correspondant à la différenciation des cellules progénitrices en adipocytes matures, sur lequel nous reviendrons ultérieurement. Le développement du TA est étroitement associé à un phénomène d'angiogenèse qui est critique pour maintenir la fonctionnalité de ce tissu. Un défaut d'angiogenèse peut induire un stress hypoxique qui diminue la sensibilité à l'insuline des adipocytes (Regazzetti et al., 2009) et une inflammation dans le TA qui participe également au développement de la résistance à l'insuline (Tanti et al., 2013; Corvera and Gealekman, 2014). De plus, lorsque le TA ne peut pas s'accroître davantage, les lipides ne sont plus stockés dans les adipocytes et s'accumulent dans des localisations ectopiques telles que le foie, les muscles et le pancréas où ils exercent des effets lipotoxiques et entraînent une résistance à l'insuline de ces organes.

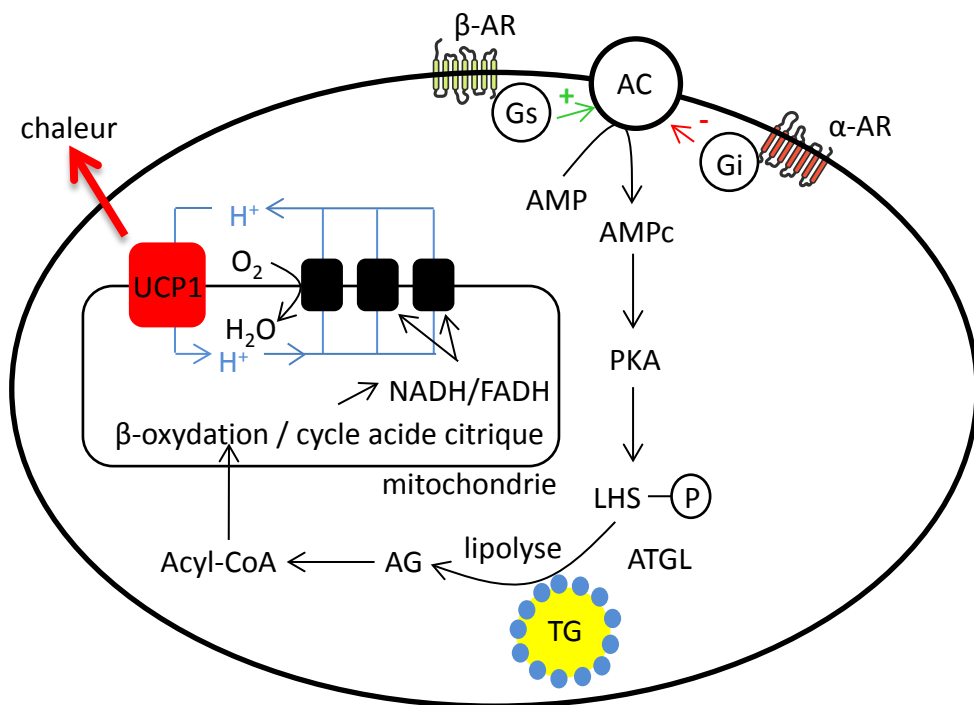


Figure 7 : Thermogénèse induite par stimulation β -adrénergique dans les adipocytes bruns

Les catécholamines, via leur liaison au récepteur β -adrénergique (β -AR) induisent l'activation de l'adenylyl-cyclase (AC) qui transforme l'AMP en AMPc. L'AMPc active la protéine kinase A (PKA) qui phosphoryle la lipase hormono-sensible (LHS). La LHS et l'ATGL (adipose triglyceride lipase) hydrolysent les triglycérides (TG) de la gouttelette lipidique ce qui conduit à la libération des acides gras (AG). L'acyl-CoA est produit à partir des AG et entre dans la mitochondrie. Son oxydation permet la production de NADH et FADH qui assurent le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale et l'établissement du gradient de protons. Ce gradient est dissipé par la protéine UCP1, conduisant à la production de chaleur (voir détails de la chaîne respiratoire dans la figure 8). A l'inverse, la liaison des catécholamines à un récepteur α -adrénergique (α -AR) inhibe la production d'AMPc.

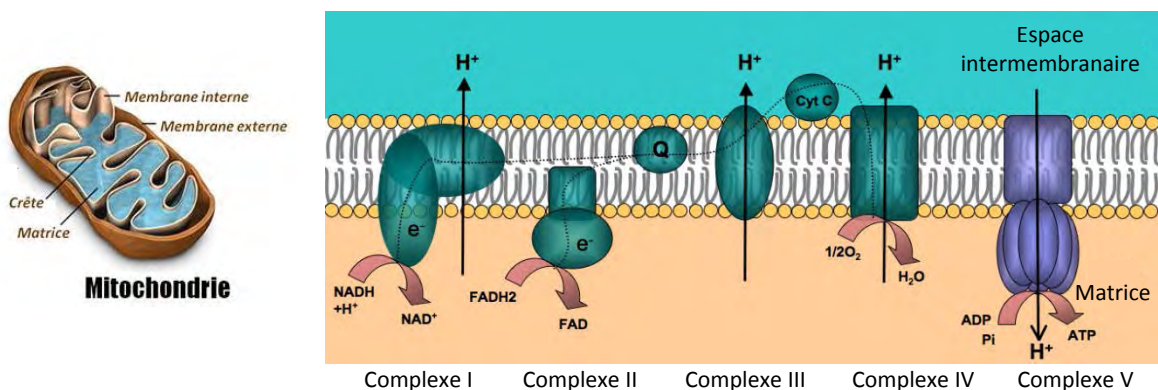


Figure 8 : La chaîne respiratoire mitochondriale

La chaîne respiratoire mitochondriale se situe à la membrane interne de la mitochondrie. Elle est composée de quatre complexes permettant d'établir le gradient de protons. Complexe I : NADH-quinone oxydoréductase, complexe II : succinate-quinone oxydoréductase, complexe III : quinol-cytochrome c oxydoréductase, complexe IV : cytochrome c oxydase. Ce gradient de protons induit la synthèse d'ATP par le complexe V (ATP synthase). En présence de la protéine UCP1, le complexe V est court-circuité, permettant la libération de chaleur sans production d'ATP.

Adapté de Bellance et al., 2009

2) Le tissu adipeux brun

On a longtemps pensé que le TA blanc était le seul présent chez l'homme adulte. Le TA brun est présent chez les animaux hibernants chez lesquels son rôle dans la régulation de la température corporelle est primordial. Il est également présent chez les nouveau-nés, mais jusqu'à récemment sa régression dans les cinq premières années de vie chez l'homme était admise, à l'exception des cas de phéochromocytome. Le phéochromocytome est une tumeur de la médullo-surrénale conduisant à une sécrétion excessive de catécholamines. Dès les années 1970, des analyses morphologiques et biochimiques ont permis de détecter la présence d'adipocytes bruns à proximité de ces tumeurs (Melicow, 1977; Ricquier et al., 1982). Chez ces patients, l'activité du TA brun est élevée et positivement corrélée aux taux plasmatiques des métabolites des catécholamines (Wang et al., 2011). A la fin des années 2000, plusieurs études ont montré que le TA brun persistait chez l'homme adulte en conditions normales (Cypess et al., 2009; Virtanen et al., 2009). Il est composé d'adipocytes contenant plusieurs petites vacuoles lipidiques ainsi que de nombreuses mitochondries. L'abondance des mitochondries et sa riche vascularisation donnent à ce tissu sa couleur brune ainsi que la capacité de brûler les lipides pour produire de la chaleur, ou thermogenèse. Cette propriété fait du TA brun une cible thérapeutique de choix pour lutter contre l'obésité, malgré la quantité relativement faible de ce tissu chez l'homme adulte (estimée à 150g (Sacks and Symonds, 2013)).

a) Principales fonctions

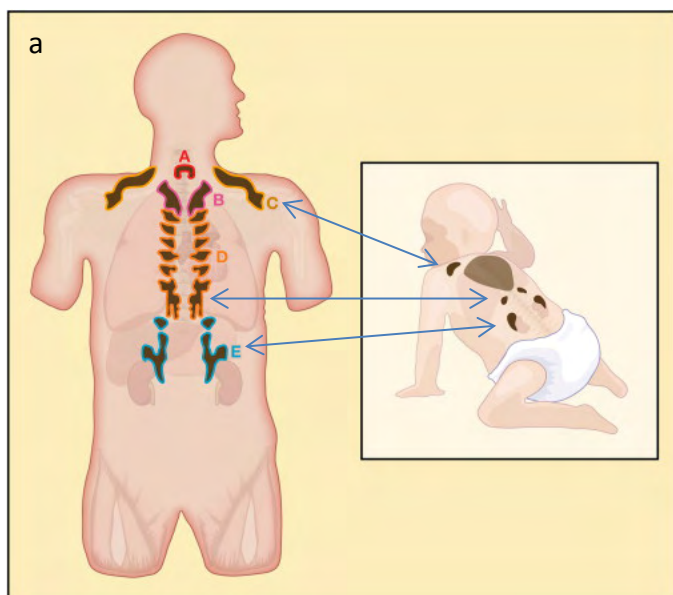
La thermogenèse

L'exposition au froid entraîne une activation du système nerveux sympathique qui libère de la noradrénaline et stimule la thermogenèse de non-frisson au niveau du TA brun. Elle est également stimulée par la triiodothyronine et l'insuline (Orava et al., 2011). L'activation des récepteurs β -adrénergiques entraîne une stimulation de la lipolyse et conduit à la formation d'acides gras libres. Ceux-ci sont oxydés par la mitochondrie et permettent la production des donneurs d'électrons NADH et FADH, essentiels au fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. Les mitochondries des adipocytes bruns expriment la protéine découplante

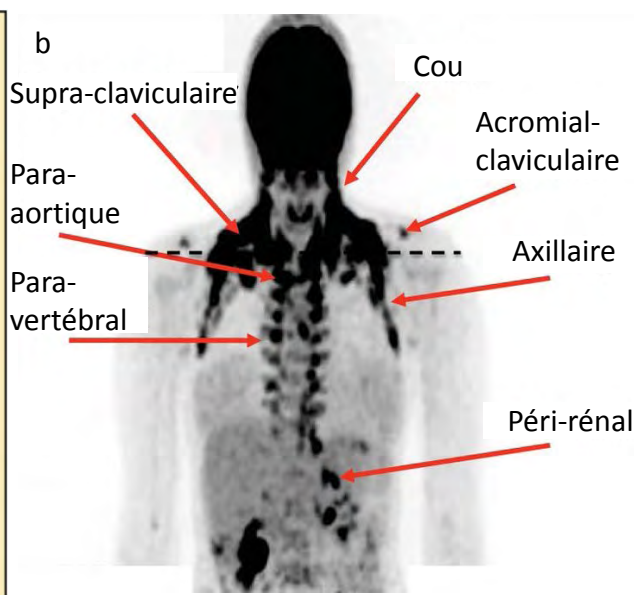
UCP1 (uncoupling protein 1) qui permet de court-circuiter l'ATP-synthase de la chaîne respiratoire mitochondriale et la production de chaleur, sans génération d'ATP (figures 7 et 8 (Bellance et al., 2009)). Il a récemment été montré que l'activation des récepteurs β -adrénergiques permet également une modification du réseau de mitochondries, passant d'un état filamenteux à un état fragmenté. Ces mitochondries fragmentées, rondes, sont plus sensibles aux acides gras libres et ainsi plus efficaces dans leur fonction de thermogénèse (Wikstrom et al., 2014).

Sécrétions adipocytaires

La découverte de la persistance du TA brun chez l'adulte étant récente, les données sur les sécrétions de ce tissu sont peu nombreuses et ont été obtenues chez la souris. Il semblerait néanmoins que les adipocytes bruns soient doués d'une capacité de sécrétion de molécules ayant une activité autocrine, paracrine et/ou endocrine, particulièrement lorsqu'ils sont activés par le froid ou une stimulation adrénergique. Les adipokines sécrétées par le TA brun sont appelées par certains auteurs « bradipokines » ou « batokines » (brown adipose tissue-derived adipokines) (Stanford et al., 2013). La sécrétion du TA brun la plus reconnue est la triiodothyronine (T3) (Silva and Larsen, 1983). En réponse au froid, le TA brun produit de la T3 grâce à l'expression de l'iodothyronine désiodase de type 2 (Dio2) qui convertit la thyroxine (T4) en T3. La T3 contribue alors aux voies de signalisation conduisant à l'activation de la thermogénèse dans les adipocytes. Des approches de transplantation de TA brun chez la souris ont mis en évidence une amélioration des paramètres métaboliques tels qu'une amélioration de la tolérance au glucose, de la sensibilité à l'insuline, diminution de la masse grasse et même une réversion de l'insulino-résistance. De façon surprenante, les effets bénéfiques d'une telle transplantation sont principalement dus à une augmentation de l'assimilation du glucose par le TA blanc et le cœur, suggérant un effet à distance du TA brun. En effet, le TA brun transplanté sécrète de l'interleukine-6 et de l'IGF-1 (insulin like growth factor-1) (Gunawardana and Piston, 2012; Stanford et al., 2013). Le TA brun activé sécrète également du FGF21 (fibroblast growth factor-21), du VEGF-A (vascular endothelial growth factor A) ou encore de la BMP8b (bone morphogenetic protein 8b) (Hondares et al., 2011; Whittle et al., 2012; Villarroja et al., 2013). Il



Adapté de Enerback, 2010



Adapté de van der Lans AA et al., 2014

Figure 9 : Localisations du tissu adipeux brun chez l'homme

a) Schéma des localisations du TA brun chez le nouveau-né et chez l'adulte. A : TA autour de la trachée/thyroïde, B : TA médiastin, C : TA supra-claviculaire, D : TA para-vertébral, E : TA supra- et péri-rénal.

b) Image de l'incorporation d'un analogue du glucose marqué non-hydrolysable (le deoxy-2-[18F]fluoro-d-glucose) par le TA brun chez l'adulte par tomographie électromagnétique à positron.

est à noter que les adipocytes bruns expriment la leptine et l'adiponectine uniquement lorsqu'ils sont inactifs et « atrophisés », ce qui fait de ces deux adipokines des marqueurs des adipocytes blancs (Cannon and Nedergaard, 2004).

b) Localisations anatomiques du tissu adipeux brun chez l'adulte et rôles physiologiques

Alors que le TA brun chez le nouveau-né participe à la régulation de sa température corporelle, le rôle physiologique du TA brun chez l'homme adulte n'est pas clairement défini. La présence de TA brun chez l'homme adulte a été détectée par des méthodes de PET-CT (positron emission tomography – computed tomography) suite à l'injection d'un analogue non-hydrolysable du glucose, le 18-FDG (18-fluorodeoxyglucose). Cette technique est utilisée pour visualiser les tissus qui incorporent d'importantes quantités de glucose, telles que les tumeurs, et a permis de mettre en évidence les localisations du TA brun, grâce à son activité métabolique élevée. L'exposition au froid (deux heures à 17-19°C avant le scan, puis pendant le scan les pieds sont placés, par alternance de 5 minutes, dans de l'eau à 5-9°C et à température ambiante) a permis de montrer une augmentation de l'absorption du 18-FDG dans les zones considérées comme du TA brun, confirmant ainsi la nature de ce TA sensible au froid. Enfin, des biopsies ont confirmé la présence d'adipocytes multiloculaires exprimant la protéine UCP1. Le TA brun chez l'homme adulte se situe dans plusieurs zones dispersées (Sacks and Symonds, 2013) (figure 9 (Enerback, 2010; van der Lans et al., 2014)). La localisation supra-claviculaire pourrait permettre de réchauffer le sang provenant de la périphérie et allant au cerveau. La localisation péri-vasculaire (autour de l'aorte, de l'artère carotide, etc.) pourrait réguler la température du sang mais aussi contrôler la vasomotricité via sa sécrétion de monoxyde d'azote (Kikuchi-Utsumi et al., 2002). Enfin, le TA brun se trouve autour de plusieurs organes tels que le cœur, les vertèbres thoraciques, les reins ou le pancréas. Sa présence le long de la colonne vertébrale pourrait assurer le bon fonctionnement des systèmes nerveux centraux et autonomes lors d'une hypothermie et protégerait les fonctions vitales de l'organisme (Sacks and Symonds, 2013).

La dépense énergétique attribuable au TA brun chez l'homme adulte a été estimée à 4.5% de la dépense énergétique totale de l'organisme (van Marken Lichtenbelt and Schrauwen, 2011).

Marqueurs blanc			Marqueurs brite			Marqueurs brun		
Adipocytes	Progéniteurs	TA entier	Adipocytes	Progéniteurs	TA entier	Adipocytes	Progéniteurs	TA entier
LEPTIN			UCP1			UCP1		
DPT		DPT	CD137	CD137		LHX8		LHX8
RESISTIN		RESISTIN	TBX1			miR-206	miR-206	miR-206
TCF21		TCF21			TCF21	miR-133	miR-133	miR-133
		HOXC8	TMEM26	TMEM26	HOXC8	MYOGENIN	MYOGENIN	
		INHBB	CITED1			ZIC1		ZIC1
ASC-1 *					TBX15	TBX15		TBX15
					SHOX2	EBF3		
HOXC9		HOXC9	HOXC9		HOXC9	EVA1		
ADIPONECTIN								
	CD34					FBXO31		
	Sca-1						Sca-1	MYLPF
	CD29					PAT2 *	CD29	
	CD90					P2RX5 *		
	PDGFRα			PDGFRα		DIO2		DIO2

Figure 10 : Marqueurs des tissus adipeux blancs, brites et bruns et de leurs adipocytes et progéniteurs chez la souris

Liste non-exhaustive des principaux marqueurs blancs, brites et bruns, décrits dans les adipocytes, les « progéniteurs » (souvent les cellules de la FSV) et les TA blanc et brun entier murin. Les adipocytes ne sont pas isolés des TA mais majoritairement obtenus après différenciation de la FSV issue des différents dépôts. Les marqueurs brites du TA entier ont été décrits dans le TA blanc inguinal après exposition au froid ou stimulation β3-adrénergique.

Adapté de Peirce et al., 2014

** Ussar et al., 2014*

Cependant, il existe une forte hétérogénéité quant à la présence, la quantité et l'activité du TA brun entre les individus (Cypess et al., 2009). En effet, la quantité de ce tissu diminue avec l'obésité. Il semblerait toutefois que l'activité du TA brun puisse augmenter après une perte de poids engendrée par chirurgie bariatrique, chez des femmes (Vijgen et al., 2012). Ensuite, le TA brun diminue avec l'âge et certains traitements pharmacologiques tels que la prise de β -bloquants (Pfannenberger et al., 2010). La prévalence du TA brun ainsi que sa quantité et son activité pourraient être plus élevées chez les femmes que chez les hommes (Au-Yong et al., 2009; Cypess et al., 2009; Pfannenberger et al., 2010), bien que ces données soient encore débattues (Cypess et al., 2012; van der Lans et al., 2013; Matsushita et al., 2014). Plusieurs stratégies ont été imaginées afin de « réveiller » le TA brun chez l'adulte pour augmenter la dépense énergétique et lutter contre l'obésité. Parmi ces stratégies potentielles figurent l'exposition au froid chronique ou des traitements stimulant le découplage de la chaîne respiratoire mitochondriale (Tseng et al., 2010). Cependant, la découverte d'un nouveau type d'adipocytes, les adipocytes brites, a suscité de « nouveaux espoirs ».

3) Les adipocytes brites

Les adipocytes brites (pour « brown in white ») ou beiges ont été caractérisés chez la souris et présentent des propriétés communes aux adipocytes blancs et bruns. En effet, ils sont localisés dans des dépôts adipeux blancs, surtout dans le TA inguinal chez la souris, mais contiennent plusieurs vacuoles lipidiques, de nombreuses mitochondries et expriment la protéine UCP1. Les marqueurs des adipocytes blancs, brites et bruns chez la souris sont illustrés dans la figure 10 (Peirce et al., 2014; Ussar et al., 2014). De nombreux travaux ont montré, toujours chez la souris, que ces adipocytes brites apparaissent suite à une exposition au froid ou une stimulation β 3-adrénergique, processus qualifié de « browning/brunisation » du TA blanc. La stimulation des adipocytes brites permet d'améliorer les paramètres métaboliques des rongeurs (Bartelt and Heeren, 2014). La perspective de les faire apparaître chez l'homme dans des dépôts adipeux blancs, qui représentent une quantité importante de TA chez l'obèse, suscite désormais un grand engouement dans la communauté scientifique. Au début des années 2010, la nature

Localisation du TA humain chez l'adulte	Marqueurs murins enrichis dans les dépôts humains
TA sous-cutané	Marqueurs blancs : LEPTIN, ADIPONECTIN
TA des couches superficielles /intermédiaires du cou	Marqueur blanc : LEPTIN Marqueurs brites : CD137, SHOX2, TMEM26
TA péri-surrénalien	Marqueurs brites : HOXC9, SHOX2, TMEM26, TBX1 Marqueurs bruns : UCP1, ZIC1, EVA1, PRDM16, PGC1 α , DIO2
TA supra-claviculaire	Marqueurs brites : CITED1, SHOX2, TMEM26, TBX1 Marqueurs bruns : UCP1, ZIC1, EVA1, PRDM16, PGC1 α , DIO2, LHX8, miR-206, miR-133
TA des couches profondes du cou	Marqueurs bruns : UCP1, ZIC1, PRDM16, PGC1 α , DIO2, LHX8, CIDEA
TA interscapulaire chez l'enfant	Marqueurs brites : SHOX2, TMEM26, TBX1, HOXC9 Marqueurs bruns : UCP1, ZIC1, EVA1, PRDM16, PGC1 α , DIO2

Figure 11 : Marqueurs murins retrouvés dans les tissus adipeux humains

Liste non-exhaustive des principaux marqueurs blancs, brites et bruns, décrits chez la souris et exprimés dans les TA entiers humains selon leur localisation.

Adapté de Peirce et al., 2014; Scheele et al., 2014; Cereijo et al., 2014

du TA brun chez l'homme adulte a été remise en question suite à plusieurs travaux montrant qu'il s'agirait non pas d'un « vrai » TA brun mais d'un TA brite (Wu et al., 2012; Jespersen et al., 2013). De plus, les marqueurs brites et bruns ne sont pas tous spécifiques de l'un ou de l'autre type adipocytaire, ce qui complique la définition de la nature de ces TA chez l'homme. Les marqueurs décrits chez la souris et exprimés dans des dépôts adipeux humains à différentes localisations sont illustrés dans la figure 11 (Cereijo et al., 2014; Peirce et al., 2014; Scheele et al., 2014).

4) Les « pink adipocytes »

Enfin, un quatrième type d'adipocyte a été proposé par le groupe de Cinti, les « pink adipocytes » (Giordano et al., 2014). La glande mammaire est composée d'adipocytes blancs qui, pendant la gestation et la période de lactation chez la souris, se transformeraient en « pink » adipocytes ou cellules épithéliales productrices de lait. Le nom de « pink » adipocytes provient du fait que ces adipocytes sont présents chez la femelle, et que les TA blancs de la glande mammaire en période de lactation prennent une couleur rose. Il est suggéré que ce phénomène de trans-différenciation adipocyte-endothélium serait réversible (Morrone et al., 2004). En effet, après la période d'allaitement, les cellules épithéliales retourneraient à leur état d'adipocyte blanc.

Les différents types d'adipocytes, hormis les « pink » adipocytes qui découleraient d'un phénomène de trans-différenciation, proviennent de la différenciation de cellules progénitrices via le processus d'adipogenèse.

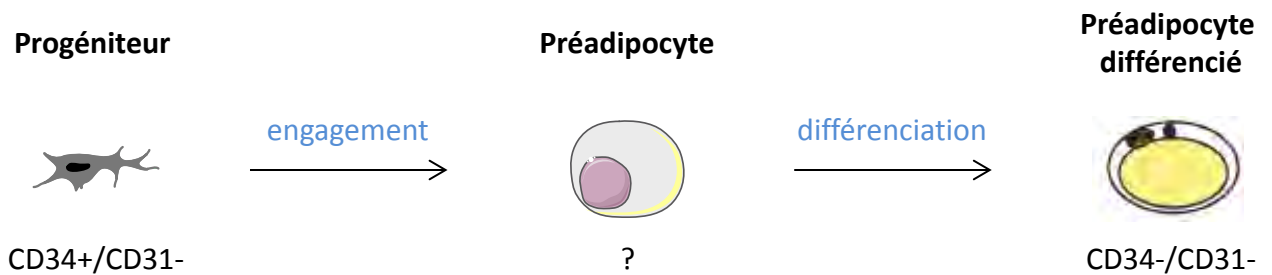


Figure 12 : L'adipogenèse

L'adipogenèse consiste en la formation d'un adipocyte à partir d'une cellule progénitrice. Chez l'homme, les cellules progénitrices sont caractérisées par l'expression de CD34 et l'absence d'expression de CD31. Leur engagement dans la voie adipocytaire conduit à la formation d'un préadipocyte pour lequel nous ne disposons pas de marqueur à l'heure actuelle. Ce préadipocyte se différencie ensuite en adipocyte, négatif pour le marqueur CD34.

II) L'adipogenèse

L'adipogenèse est le processus de formation d'un nouvel adipocyte à partir d'une cellule progénitrice (figure 12). L'adipogenèse se déroule en deux grandes étapes. La première correspond à l'engagement des cellules progénitrices dans la voie adipocytaire, conduisant à la formation d'un préadipocyte. La deuxième consiste en la différenciation des préadipocytes en adipocytes matures.

Les adipocytes blancs et bruns possèdent une origine développementale différente, tout du moins chez la souris (Moulin et al., 2001; Timmons et al., 2007). En 1551, le naturaliste Konrad Gessner aurait décrit le TA brun comme n'étant ni du gras ni du muscle mais « entre les deux » (d'après les revues de Cannon et Nedergaard (Cannon and Nedergaard, 2008) et de Modica *et al.* (Modica and Wolfrum, 2013)). Cette observation a été confirmée par des approches de suivi cellulaire chez la souris qui ont mis en évidence que les adipocytes bruns proviennent d'un progéniteur commun aux muscles squelettiques, originaire du mésoderme paraxial et positif pour le facteur myogénique Myf5. Les adipocytes blancs, pour une partie, proviennent de cellules du mésoderme latéral négatives pour Myf5, bien qu'une étude récente mette en doute ce résultat (Sanchez-Gurmaches et al., 2012). Certains adipocytes blancs, notamment ceux de la tête, auraient pour origine la crête neurale (Billon et al., 2007; Takashima et al., 2007). Les TA blancs viscéraux auraient une origine mésothéliale, ce qui n'est pas le cas pour le TA blanc sous-cutané ni pour le TA brun (Chau et al., 2014) (pour plus de détails sur le développement embryonnaire des TA, voir revue « *L'adipogenèse des tissus adipeux blancs : influence du microenvironnement* » Obésité 2013). Ces résultats suggèrent que les progéniteurs adipocytaires murins blancs et bruns chez l'adulte sont différents. Cependant, la récente découverte de la persistance du TA brun chez l'homme adulte et la difficulté à prélever ce tissu, de par ses localisations anatomiques particulières, compliquent l'identification du progéniteur adipocytaire brun chez l'homme. L'origine des adipocytes bruns chez la souris fait débat. Deux hypothèses se font face, soutenues parfois par le même type d'approche expérimentale. Les adipocytes bruns résulteraient de la trans-différenciation des adipocytes blancs matures

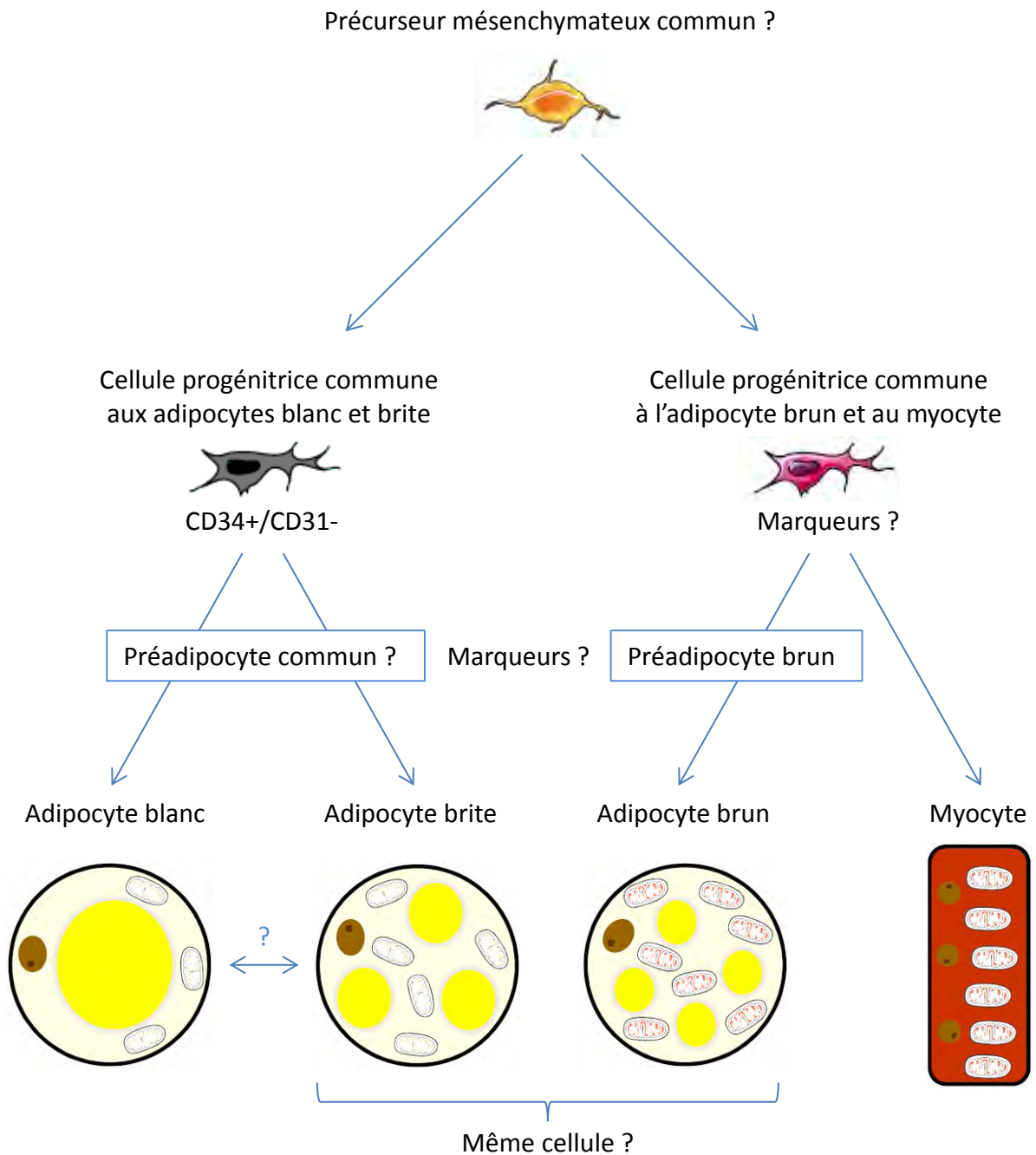


Figure 13 : Origines des adipocytes blancs, brites et bruns chez l'homme

L'origine des adipocytes blancs ainsi que celles des adipocytes brites et bruns ne sont pas clairement établies. Ils proviendraient d'un précurseur mésenchymateux commun. Les cellules progénitrices CD34+/CD31- des TA blanc pourraient être à l'origine des adipocytes blancs et brites, leurs préadipocytes ne sont pas connus. Il n'est pas exclu que les adipocytes brites résultent de la trans-différenciation des adipocytes blancs.

Les adipocytes bruns et les myocytes auraient un progéniteur commun, dont les marqueurs ne sont pas identifiés.

A ce jour, la caractérisation des adipocytes brites et bruns ne permet pas de définir si ces deux types cellulaires sont réellement différents, ce qui complique l'identification de leur(s) origine(s).

(Barbatelli et al., 2010). Par des approches de suivi du lignage adipocytaire *in vivo*, certains travaux ont montré que les adipocytes brites proviennent de la transformation directe des adipocytes blancs (Rosenwald et al., 2013) alors que d'autres défendent l'hypothèse qu'ils proviennent de la différenciation de progéniteurs adipocytaires (Lee et al., 2012; Wang et al., 2013). Bien que le progéniteur brite ne soit pas clairement identifié à l'heure actuelle, il semble qu'il soit différent du progéniteur brun. Il a récemment été suggéré que les adipocytes brites pourraient avoir une origine commune aux muscles lisses (Long et al., 2014). Une caractérisation des progéniteurs adipocytaires permettra de savoir si le progéniteur brite est commun aux adipocytes blancs et aux brites ou spécifique aux adipocytes brites. (figure 13)

1) Les progéniteurs adipocytaires

a) Les progéniteurs adipocytaires blancs

Les cellules progénitrices du TA blanc humain sont caractérisées par l'expression du marqueur CD34 et l'absence de CD31 et de CD45 (Planat-Benard et al., 2004; Sengenès et al., 2005) et possèdent la capacité de se différencier en adipocyte (Sengenès et al., 2005). L'adipocyte mature étant une cellule incapable de prolifération et de division, les cellules progénitrices permettent le renouvellement physiologique des adipocytes, bien que cela n'ait jamais été directement montré. Le renouvellement des adipocytes chez l'homme adulte est estimé à environ 10% chaque année (Spalding et al., 2008). Ces cellules permettent également la formation de nouveaux adipocytes lors d'apports énergétiques excessifs et d'un besoin accru de stockage des lipides dans le TA (Spalding et al., 2008; Maumus et al., 2011). Elles possèdent également des capacités de différenciation endothéliale (Miranville et al., 2004; Bourlier et al., 2008), myofibroblastique (Bourlier et al., 2012) et ostéogénique (Maumus et al., 2011). De plus, la fraction stroma-vasculaire (FSV) issue de TA humain, contenant des cellules progénitrices mais aussi des cellules endothéliales et immunes, peut se différencier en cellules des lignages ostéogénique, chondrogénique, myogénique et neuronal (Zuk et al., 2002). Il est à noter que les

cellules de la FSV sont souvent considérées comme les précurseurs adipocytaires alors qu'elle contient aussi d'autres types cellulaires.

Chez la souris, les progéniteurs adipocytaires blancs sont caractérisés par l'expression des marqueurs CD34, CD29, Sca-1, CD90, PDGFR α (platelet-derived growth factor receptor α) et CD24 et l'absence de marqueurs hématopoïétiques (Lin- et CD45-) et endothéliaux (CD31-) (Rodeheffer et al., 2008). Certains de ces marqueurs, comme Sca-1 et Lin, ne possèdent pas d'équivalent chez l'homme (Berry et al., 2014).

L'origine des cellules progénitrices du TA blanc chez l'adulte fait encore débat. Certaines études suggèrent que ces cellules progénitrices proviennent de la vasculature du TA. Par des modèles génétiques murins de suivi des cellules exprimant PPAR γ , le facteur clé de la différenciation adipocytaire, il a été montré que les adipocytes proviennent de cellules progénitrices déjà engagées dans la voie adipocytaire et qui se situent, pour certaines tout du moins, dans ou à proximité des vaisseaux sanguins du TA. Ces cellules expriment le marqueur péricytaire PDGFR β (platelet-derived growth factor receptor β) (Tang et al., 2008). De plus, les cellules progénitrices engagées dans la voie adipocytaire expriment le facteur à doigt de zinc ZFP423 (Gupta et al., 2010). Ce marqueur est retrouvé dans les cellules endothéliales ainsi que dans les péricytes (Gupta et al., 2012) ce qui a conduit les auteurs à conclure que les cellules progénitrices proviennent de la vasculature. Cependant, il n'est pas clairement montré que ces cellules endothéliales ou ces péricytes se différencient en adipocytes et il peut être envisagé que le marqueur ZFP423 soit simplement exprimé par différents types cellulaires. Enfin, l'insertion de LacZ sous le promoteur de la VE-cadhérine (vascular endothelial cadherin), exprimée uniquement par les cellules endothéliales, indique que certains adipocytes blancs et bruns murins proviennent de l'endothélium (Tran et al., 2012), suggérant que l'endothélium est l'origine commune de ces deux types cellulaires. En revanche, la démonstration d'un tel mécanisme chez l'homme n'est pas réellement convaincante. Dans cette même étude, la culture d'explants de TA humain en gel dans un milieu pro-angiogénique, puis stimulés à la rosiglitazone, entraîne le « bourgeonnement » de cellules ayant des caractéristiques morphologiques de cellules endothéliales et des capacités à accumuler des gouttelettes lipidiques. La nature de ces cellules n'est pas clairement établie et il est tout à fait envisageable

que ces cellules endothéliales accumulent des gouttelettes lipidiques sans devenir pour autant des adipocytes fonctionnels. Enfin, l'hypothèse de l'origine endothéliale des adipocytes a été réfutée par des approches de suivi cellulaire. En conditions physiologiques, les adipocytes blancs du TA murin ne proviennent ni de cellules exprimant (ou ayant exprimé) la VE-cadhérine, ni Tie2, deux marqueurs des cellules endothéliales (Berry and Rodeheffer, 2013).

b) Les progéniteurs adipocytaires bruns

Le progéniteur brun n'est pas encore identifié chez l'homme. Aussi surprenant que cela puisse paraître, la caractérisation des cellules progénitrices du TA brun chez la souris est très peu étudiée. La plupart des travaux traitant de l'adipogenèse brune ont utilisé des cellules de la FSV murine, primaires ou immortalisées, sans isoler spécifiquement les cellules progénitrices, et se sont intéressés aux mécanismes, gènes et facteurs de transcription impliqués dans l'adipogenèse brune. Il semblerait que les progéniteurs adipocytaires bruns possèdent des marqueurs de surface communs aux progéniteurs blancs. En effet, le groupe de Tseng et al. a montré que les cellules CD45-/Sca-1+/Mac1- isolées du TA brun possèdent des capacités adipogéniques brunes. Ces cellules sont également retrouvées dans le muscle squelettique et dans le TA blanc sous-cutané (Schulz et al., 2011). Par des analyses des cellules de la FSV de TA brun en cytométrie de flux, la présence de cellules CD45-/CD29+/CD24+/Sca-1+ a été mise en évidence, comme dans le TA blanc. Cependant, les capacités adipogéniques de ces cellules n'ont pas été déterminées (Tran et al., 2012). Étant donné que les progéniteurs bruns et blancs semblent posséder des origines développementales différentes, il serait intéressant de comparer le phénotype de ces deux types cellulaires. Existe-t-il des marqueurs spécifiques à chaque population ? L'identification de protéines membranaires spécifiques aux progéniteurs bruns permettrait de les isoler et d'étudier plus en détails le processus d'adipogenèse brune ainsi que sa régulation.

c) Les progéniteurs adipocytaires brites

Chez l'homme, la présence d'adipocytes brites, tels qu'ils existent chez la souris dans le TA blanc sous-cutané, n'a pas été prouvée. De fait, le progéniteur adipocytaire brite n'est pas connu chez l'homme. Cependant, les progéniteurs adipocytaires blancs (CD34+/CD31-) sont capables de se différencier en adipocytes UCP1+ après un traitement à la rosiglitazone, un agoniste de PPAR γ (Elabd et al., 2009). Il se pourrait que ces adipocytes UCP1+ proviennent d'une sous-population de progéniteurs spécifiques ou bien que les progéniteurs blancs soient capables de se différencier en adipocytes brites sous certaines conditions. Certains travaux, réalisés à partir de TA entier, suggèrent que le TA brun supra-claviculaire pourrait être composé d'adipocytes brites. En effet, des marqueurs murins brites, CD137 et Tmem26, sont plus exprimés dans les TA supra-claviculaire, retro-péritonéal ou médiastin humain que certains marqueurs du brun comme Zic1, Eva1 et Ebf3 (Sharp et al., 2012; Wu et al., 2012). Chez la souris, il n'existe pas de marqueurs clairs discriminant les progéniteurs brites des progéniteurs blancs, peut-être parce que ce sont les mêmes cellules qui, suite à des signaux particuliers, vont donner des adipocytes blancs ou brites. Ce progéniteur commun a été mis en évidence par une approche de suivi du lignage adipocytaire et est caractérisé par l'expression de PDGFR α . Suite à un régime gras ou une stimulation β 3-adrénergique, les cellules PDGFR α positives sont capables de donner des adipocytes blancs et brites respectivement (Lee et al., 2012). De plus, les modèles expérimentaux utilisés sont souvent différents et spécifiques à chaque groupe de recherche. A partir de cellules immortalisées de FSV inguinale, il a été montré que les clones ayant les plus forts potentiels de différenciation brite (notamment d'induction d'UCP1) expriment les marqueurs membranaires CD137 et Tmem26. Ces marqueurs sont retrouvés davantage dans le TA inguinal que dans le TA brun chez la souris (Wu et al., 2012).

2) Modèles cellulaires d'étude de l'adipogenèse

A l'heure actuelle, la plupart des données disponibles sur la mécanistique du processus d'adipogenèse blanche ont été obtenues à l'aide de lignées cellulaires murines. Travailler avec des lignées cellulaires donne l'avantage d'utiliser une population cellulaire homogène, plus

facilement transfectable que des cellules primaires et offre un outil intéressant pour l'étude des mécanismes moléculaires de l'adipogenèse. Les mécanismes d'adipogenèse brune ont été déterminés principalement avec des cellules de la FSV de TA brun murin, immortalisées ou non. Il existe quelques lignées humaines, permettant l'étude de l'adipogenèse blanche et brune ou brite (Beranger et al., 2012).

a) Les principales lignées cellulaires murines

Dans les années 1970, la lignée cellulaire pluripotente C3H10T1/2 a été obtenue à partir de fibroblastes embryonnaires de souris C3H (Reznikoff et al., 1973). Cette lignée nécessite l'ajout d'agonistes PPAR γ ou de 5-azacytidine (inhibiteur de la méthylation de l'ADN) (Taylor and Jones, 1979) dans le milieu de différenciation pour former des adipocytes, et est considérée comme une des moins engagées dans la voie adipocytaire. Elle constitue ainsi un modèle pour l'étude des mécanismes précoces de l'adipogenèse, ou engagement adipocytaire. L'établissement des lignées cellulaires 3T3-L1 et 3T3-F442A à partir de clones embryonnaires de souris Swiss 3T3 et Ob 17 à partir de TA épидидymaire de souris C57Bl/6J ob/ob, a permis de décrypter les mécanismes de l'adipogenèse terminale, ou différenciation adipocytaire. En effet, ces lignées sont déjà engagées dans la voie adipocytaire, un arrêt de leur prolifération suffit à les faire différencier en adipocyte (Green and Meuth, 1974; Green and Kehinde, 1975, 1976; Negrel et al., 1978). La lignée 3T3-F442A semble plus avancée encore que la lignée 3T3-L1 dans la voie adipocytaire car son implantation dans des souris athymiques permet la formation d'un panicule adipeux, contrairement aux cellules 3T3-L1 (Green and Kehinde, 1979; Otto and Lane, 2005). Enfin, à partir de souris exprimant le transgène SV40 sous le promoteur aP2 et développant spontanément des tumeurs au niveau du TA brun (hibernoma), la lignée pré-adipocytaire brune HIB-1B a été créée. Ces cellules expriment UCP1 suite à des stimulations adrénergiques (Ross et al., 1992; Klaus et al., 1994).

b) Lignées cellulaires humaines

La lignée PAZ-6 est la seule lignée cellulaire provenant de l'immortalisation de cellules de la FSV issue de TA brun de jeunes enfants (localisation du tissu et âge des donneurs non renseignés). Ces cellules, une fois différenciées, présentent une fonction lipolytique. En revanche, leur caryotype est anormal (Zilberfarb et al., 1997). Peu d'études ont utilisé cette lignée. La lignée LiSa-2 (liposarcome) est issue de cellules accumulant des gouttelettes lipidiques, provenant d'une métastase dans le TA rétro-péritonéal d'un homme de 53 ans. Cette lignée « cancéreuse » présente une altération importante du caryotype, avec un nombre de chromosomes allant de 67 à 126 (Wabitsch et al., 2000). Le même auteur a ensuite caractérisé les cellules SGBS (Simpson Golabi-Behmel syndrome) obtenues à partir de FSV de TA sous-cutané abdominal d'un enfant de 3 mois ayant la maladie du même nom. Cette maladie se caractérise par une croissance excessive, des anomalies rénales et une prédisposition au développement de tumeurs intra-abdominales. Les cellules SGBS ne sont pas immortalisées, conservent des capacités adipogéniques élevées avec les passages et meurent à passage 70 (Wabitsch et al., 2001). La lignée Chub-S7 provient de l'immortalisation de cellules de la FSV issue de TA sous-cutané abdominal d'une femme adulte obèse. Elle présente un caryotype normal et des capacités de différenciation blanche (Darimont et al., 2003). Enfin, les hMADS (human multipotent adipose-derived stem cells) ont été obtenues à partir de cellules de la FSV issue de TA sous-cutané de jeunes enfants (moins de 7ans), sélectionnées par leur capacité d'adhésion rapide au plastique. Cette lignée présente plusieurs avantages. Elle conserve ses capacités adipogéniques et un caryotype normal avec les passages (Rodriguez et al., 2004; Rodriguez et al., 2005). De plus, ces cellules possèdent des capacités de différenciation blanche et brune, ce qui en fait un outil intéressant pour étudier la régulation de la différenciation dans ces deux voies adipogéniques (Elabd et al., 2009). Ces cellules possèdent également des potentiels de différenciation dans les lignages musculaire (Rodriguez et al., 2005), chondrogénique (Roux et al., 2013), ostéogénique (Elabd et al., 2007) et endothélial (Shoji et al., 2010).

c) Les cellules primaires

L'utilisation de cellules primaires permet l'étude des régulations physiologiques de l'adipogenèse en fonction des caractéristiques des donneurs. Elles peuvent être isolées à partir de dépôts adipeux provenant de différentes localisations anatomiques, d'individus des deux sexes, avec ou sans pathologies métaboliques et ayant un indice de masse corporel différent, ce qui représente des avantages comme des inconvénients. L'âge du donneur est également à prendre en compte, les capacités adipogéniques diminuant avec l'âge (Sepe et al., 2010). La plupart des travaux chez l'homme utilisent les cellules de la FSV issue de TA blanc, parfois appelées à tort préadipocytes. Cette population cellulaire est hétérogène, composée de cellules progénitrices, endothéliales et immunes (dont la quantité augmente avec l'obésité). L'utilisation de FSV permet de conserver les proportions stœchiométriques des différents types cellulaires du tissu et d'étudier l'adipogenèse et ses régulations dans un contexte proche de la physiologie. La présence des cellules endothéliales et immunes module l'adipogenèse par leurs sécrétions et les contacts cellules-cellules. Cependant, les propriétés des cellules progénitrices ne peuvent être étudiées qu'à partir de cellules progénitrices isolées pour éviter tout effet confondant dû aux autres populations cellulaires. L'isolement de ces cellules peut se faire grâce à leur propriété d'adhésion au plastique. Cependant, la pureté de la population ainsi obtenue n'est jamais indiquée. Elles peuvent aussi être isolées par tri magnétique ou par FACS grâce à l'expression du CD34 et l'absence d'expression du CD31 qui permettent de les distinguer des cellules immunes (CD34-) et endothéliales (CD31+). Enfin, les cellules de la FSV ou les cellules progénitrices sont rarement utilisées natives (sans passage), or le phénotype des cellules et leurs capacités adipogéniques sont modifiés avec la culture et les passages (Wabitsch et al., 2001; Maumus et al., 2011). Il paraît ainsi essentiel que les études mentionnent clairement le type cellulaire utilisé et que la nomenclature de la FSV, comme celle des cellules progénitrices, soit harmonisée pour éviter toute confusion dans l'interprétation des résultats.

d) Protocoles d'adipogenèse *in vitro*

Les différences homme-souris sont également retrouvées dans la façon d'induire la différenciation adipocytaire, ce qui peut entraîner de fait des résultats différents et ajoute de la complexité à la transposition des données murines vers l'homme. Dans ce paragraphe, je traiterai uniquement des protocoles d'adipogenèse utilisés pour les cellules primaires. Une des grandes différences est la présence de sérum dans le milieu adipogénique tout au long du protocole chez la souris alors qu'il n'est pas utilisé chez l'homme, puisqu'il inhibe l'adipogenèse (la question de la nécessité de la prolifération avant la différenciation est soulevée) (Skurk et al., 2007; Lee et al., 2012). Le milieu adipogénique, utilisé au laboratoire pour les cellules progénitrices primaires humaines, est composé d'insuline, de glucocorticoïde, de triiodothyronine (T3) et de transferrine pendant 10 jours, supplémenté ou non en rosiglitazone (agoniste PPAR γ) ou isobutylmethylxanthine (IBMX, inhibiteur des phosphodiésterases qui augmente les taux intracellulaires d'AMPc) les trois premiers jours. Le milieu adipogénique pour les cellules primaires murines est également composé d'insuline et de T3 pendant 6 jours, supplémenté en IBMX, glucocorticoïde et indométacine (anti-inflammatoire non-stéroïdien et agoniste PPAR γ) les deux premiers jours. Les agents inducteurs ne sont pas tous identiques et les concentrations utilisées varient d'un modèle à l'autre et d'un laboratoire à l'autre. Il n'existe malheureusement pas de « référence » à l'heure actuelle, ce qui permettrait pourtant d'harmoniser les données (Scott et al., 2011).

3) Les étapes de l'adipogenèse

L'adipogenèse est classiquement décrite comme un processus se déroulant en deux grandes étapes (Rosen and MacDougald, 2006). La première correspond à l'engagement, ou détermination, de la cellule progénitrice (cellule multipotente ayant des potentiels de différenciation dans plusieurs lignages : adipocytaire, myogénique et ostéogénique par exemple) dans la voie adipocytaire pour donner un préadipocyte (cellule engagée ayant un potentiel restreint au lignage adipocytaire). Chez la souris, le préadipocyte est caractérisé par la disparition du marqueur CD24 (Berry and Rodeheffer, 2013) et par l'expression de Pref-1

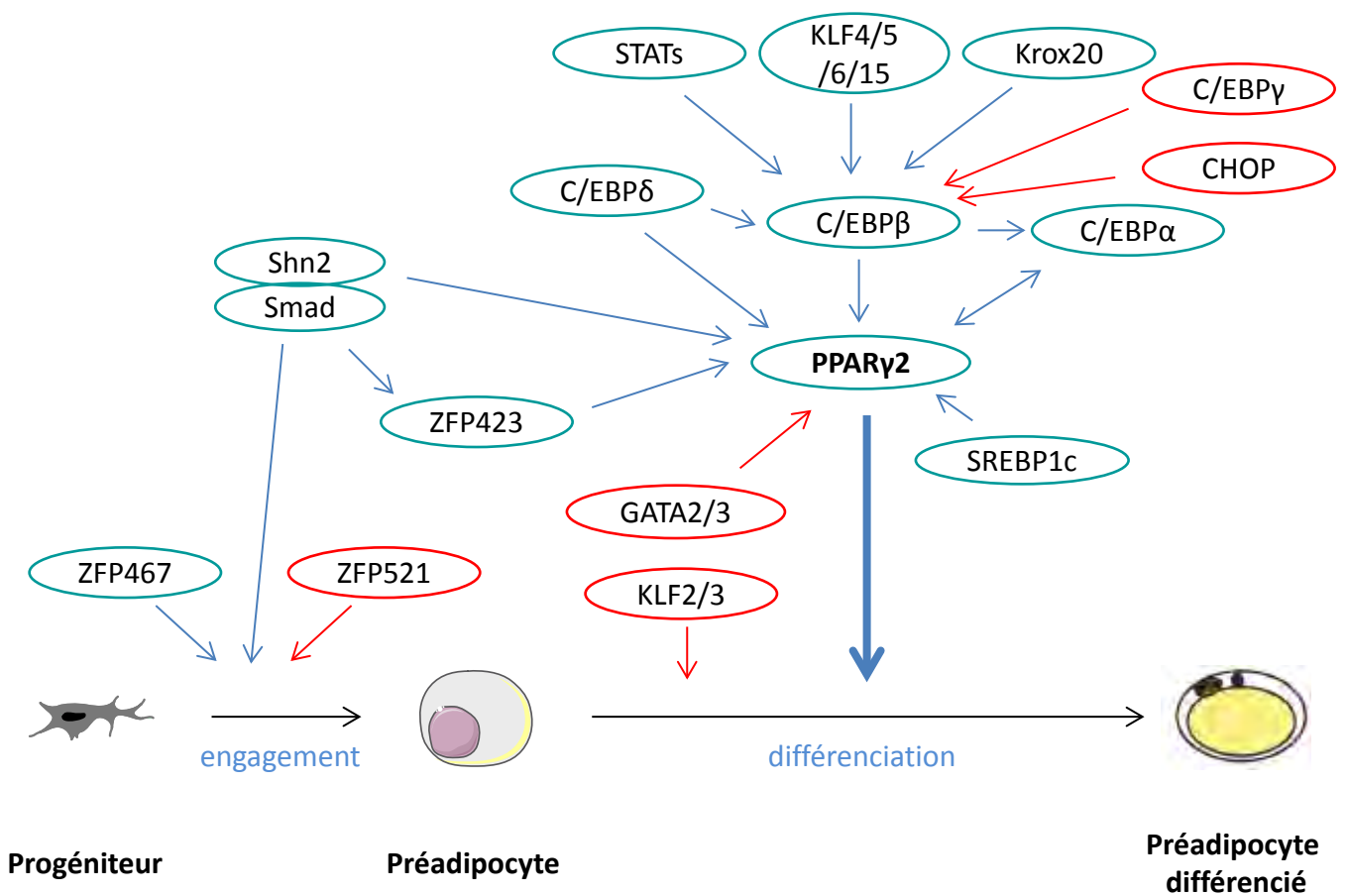


Figure 14 : Facteurs de transcription impliqués dans le contrôle de l'adipogénèse

En vert, les facteurs pro-adipogéniques ; en rouge, les facteurs anti-adipogéniques. La chronologie d'expression des différents facteurs n'est pas strictement respectée.

(preadipocyte factor-1 ou Dlk-1, protein delta homolog 1) (Sul, 2009). Cependant, ce marqueur n'est pas relevant chez l'homme. En effet, il est très faiblement exprimé par les cellules progénitrices primaires humaines (données du laboratoire). La caractérisation du préadipocyte murin par l'absence d'expression de CD24 ne permet pas d'isoler cette cellule et d'étudier spécifiquement cet état du processus de l'adipogenèse. De plus, l'expression du CD24 par les cellules progénitrices humaines n'a pas été étudiée. De fait, l'identification d'un marqueur de surface spécifique au préadipocyte humain est nécessaire pour étudier la régulation de l'étape d'engagement adipocytaire. La seconde étape consiste en la différenciation terminale du préadipocyte en adipocyte (cellule mature, possédant les fonctions de lipolyse et de sécrétions d'adipokines). Certaines études suggèrent que les préadipocytes (growth-arrested) nécessitent une phase de prolifération pour entrer dans la différenciation terminale (Fajas, 2003). La nécessité de cette étape d'expansion clonale mitotique est étayée par des études sur les lignées murines 3T3-L1 (Yeh et al., 1995; Reichert and Eick, 1999; Tang et al., 2003) mais reste controversée, même sur ce modèle (Qiu et al., 2001; Liu et al., 2002). Chez l'homme, et plus particulièrement sur les cellules progénitrices humaines primaires, peu de données sont disponibles sur l'étape d'expansion clonale mitotique et il semblerait qu'elle n'ait pas lieu (Newell et al., 2006).

4) Les mécanismes moléculaires de l'adipogenèse

La plupart des données disponibles concernant les mécanismes moléculaires de l'adipogenèse proviennent de lignées préadipocytaires murines telles que 3T3-L1, 3T3-F442A ou encore Ob17. De fait, les mécanismes contrôlant la différenciation terminale sont mieux connus que ceux de l'engagement adipocytaire. Ces études ont permis de montrer que l'adipogenèse est finement régulée par de nombreux facteurs de transcription, dont les principaux sont illustrés dans la figure 14. Pour revues, voir (Otto and Lane, 2005; Rosen and MacDougald, 2006; Gesta et al., 2007; Cristancho and Lazar, 2011).

a) Les facteurs de transcription de l'engagement adipocytaire

Peu de facteurs de transcription sont connus pour leur implication dans l'engagement adipocytaire. Cependant, la plupart appartiennent à la voie de signalisation des BMPs (bone morphogenetic proteins). L'utilisation de la lignée cellulaire multipotente C3H10T1/2 a permis de montrer que plusieurs membres de la famille des BMPs sont capables d'induire l'engagement adipocytaire. En effet, alors que les cellules préadipocytaires 3T3-L1 différencient avec un milieu adipogénique composé d'insuline, d'IBMX et de dexaméthasone, les cellules C3H10T1/2 en sont incapables. Par contre, le traitement de ces cellules avec BMP4 et ce milieu de différenciation permet leur différenciation adipocytaire, montrant que BMP4 permet de les engager (Tang et al., 2004). De même, BMP2 permet leur différenciation adipocytaire lorsqu'elle est ajoutée à la troglitazone (un agoniste PPAR γ), alors que la troglitazone seule n'y parvient pas (Hata et al., 2003). Enfin, BMP7 induit l'engagement et la différenciation de cette lignée dans la voie adipocytaire brune (Tseng et al., 2008). La voie de signalisation induite par les BMPs comprend l'activation par phosphorylation de p38MAPK et des facteurs de transcription Smad1/5/8 (small mother against decapentaplegic), qui recrutent à leur tour Smad4. Le complexe Smad1/5/8/4 entre dans le noyau et régule l'expression de plusieurs gènes cibles possédant des éléments de liaison aux Smads (SBE, smad-binding elements) dans leur promoteur (Massague et al., 2005). Le SBE canonique est une séquence CAGAC ou AGAC (Shi et al., 1998) mais Smad1 peut aussi se lier à des régions de l'ADN riche en GC (Kim et al., 1997; Kusanagi et al., 2000). La délétion de Smad4 par RNAi inhibe l'engagement dans la voie adipocytaire blanche induit par BMP2 (Huang et al., 2009). Smad1/4 possède un site de liaison à l'ADN sur le promoteur du gène de la lysyloxidase (Lox) qui est nécessaire à la différenciation, sa délétion empêchant l'adipogenèse (Huang et al., 2009). Le promoteur de PPAR γ 2 comporte six séquences AGAC. Les BMPs permettent d'une part d'augmenter la transcription de PPAR γ 2 via les Smads, et d'autre part d'augmenter son activité transcriptionnelle via l'activation de p38MAPK (Hata et al., 2003). L'expression de PPAR γ 2 est régulée par le complexe Smad1/4/Schnurri-2, de concert avec C/EBP α (Jin et al., 2006). Le knock-down de la protéine à doigt de zinc Schnurri-2 (Shn2) chez la souris entraîne une diminution des TA blancs mais pas du brun (Jin et al., 2006). ZFP423, une autre protéine à doigt de zinc, forme un complexe inactif

avec WISP2 (WNT1 inducible signaling pathway protein 2). Lors d'une stimulation avec BMP4, le complexe ZFP423/WISP2 est dissocié par les Smads ce qui permet à ZFP423 d'entrer dans le noyau et d'amplifier les effets des BMPs sur l'engagement dans les voies adipocytaires blanche et brune (Gupta et al., 2010; Hammarstedt et al., 2013). L'expression de ZFP423 dans des fibroblastes murins non-adipogéniques permet d'augmenter l'expression de PPAR γ 2 et d'induire l'adipogenèse alors que la délétion de ZFP423 par shRNA dans des cellules 3T3-L1 empêche leur différenciation. De plus, les embryons de souris knock-down pour ZFP423 présentent une diminution forte de l'adipogenèse blanche et brune (Gupta et al., 2010). La génération de souris exprimant la GFP sous le promoteur de ZFP423 a permis d'isoler les cellules exprimant ZFP423 de la FSV des TA inguinaux et épidydimaires et de montrer que ces cellules ont plus de capacités adipogéniques, expriment plus fortement les gènes adipocytaires et plus faiblement les gènes anti-adipocytaires que les cellules n'exprimant pas ZFP423 (Gupta et al., 2012). Ces résultats suggèrent que ZFP423 pourrait être un marqueur du préadipocyte chez la souris. Par la suite, d'autres ZFP ont été décrites pour leur rôle dans l'engagement adipocytaire, ZFP467 promouvant l'engagement adipocytaire au détriment de l'engagement ostéoblastique (Quach et al., 2011) et ZFP521 inhibant l'engagement adipocytaire blanc et brun (Kang et al., 2012). Enfin, le facteur de transcription PBX1 (pre-B-cell leukemia transcription factor) joue un rôle dans la régulation de l'engagement adipocytaire et la prolifération des cellules de la lignée hMADS et inhibe la différenciation de ces cellules. De façon intéressante, l'expression de PBX1 dans les cellules progénitrices du TA blanc humain est positivement corrélée à l'indice de masse corporelle (IMC), suggérant que les cellules progénitrices de sujets obèses pourraient être bloquées dans un état indifférencié (Monteiro et al., 2011).

b) Les facteurs de transcription de la différenciation terminale

Les facteurs de transcription les mieux décrits pour leur rôle dans la différenciation terminale blanche s'avèrent commun à l'adipogenèse blanche et brune. Ces facteurs sont les PPARs (peroxisome proliferator-activated receptor), la famille des C/EBPs (CCAAT enhancer binding proteins) et SREBP1c (sterol regulatory element binding protein), qui ont été énormément

étudiés par le groupe de Spiegelman. A ces facteurs-là s'ajoutent d'autres facteurs de transcriptions et co-facteurs spécifiques à la différenciation blanche et brune. Chronologiquement au cours de l'adipogenèse, les expressions précoces et transitoires de C/EBP β et C/EBP δ induisent l'expression de C/EBP α qui, à son tour, induit l'expression de PPAR γ 2. C/EBP α et PPAR γ 2 se régulent mutuellement et contribuent à l'expression de gènes cibles qui permettent l'acquisition des fonctionnalités adipocytaires. Les C/EBPs induisent également l'expression de SREBP1c de façon concomitante à celle de PPAR γ 2. SREBP1c joue un rôle important dans l'expression des gènes de la lipogenèse. Les adipocytes matures expriment également PPAR γ 2, C/EBP α et SREBP1c qui sont essentiels à leur fonction et survie. Tous ces facteurs de transcriptions agissent sur leur site de liaison à l'ADN grâce à leur interaction avec des co-activateurs à la suite de leur dissociation des co-répresseurs (Farmer, 2006).

PPAR γ : Le régulateur clé de la différenciation terminale est PPAR γ (Tontonoz and Spiegelman, 2008). La présence de plusieurs promoteurs sur le gène PPARG procure deux isoformes, PPAR γ 1 et PPAR γ 2. Alors que PPAR γ 1 est exprimé par de nombreux organes, PPAR γ 2 est spécifique aux TA, blanc et brun. La découverte de PPAR γ 2 s'est faite au début des années 1990 (Graves et al., 1992; Tontonoz et al., 1994). Ce facteur de transcription est un récepteur nucléaire qui forme un hétérodimère avec les RXRs (retinoid X receptors) et régule l'expression de nombreux gènes cibles possédant des éléments de réponse PPRE (PPAR response elements) dans leur promoteur. PPAR γ est considéré comme nécessaire et suffisant pour induire la différenciation terminale. En effet, son expression permet d'induire la différenciation (Tontonoz et al., 1994) et sa délétion empêche toute différenciation adipocytaire *in vitro* et *in vivo* (Rosen et al., 1999; Wang et al., 2013). Les ligands endogènes de PPAR γ ne sont toujours pas connus. Plusieurs dérivés lipidiques sont proposés comme candidats (acides gras oxydés, prostaglandines, acide lysophosphatidique, etc.). Les agonistes pharmacologiques de PPAR γ appartiennent à la famille des thiazolidinediones qui sont/ont été commercialisés comme anti-diabétiques et classiquement utilisés pour induire l'adipogenèse *in vitro*.

C/EBPs : Les différents membres de la famille des C/EBPs proviennent de gènes situés sur des chromosomes différents. Leurs expressions ne sont pas restreintes aux TA. Ces facteurs de transcription forment des homo- ou hétérodimères via leur domaine leucine zipper et se lient

aux régions régulatrices des gènes possédant une séquence CCAAT. Les expressions de C/EBP β et δ sont induites par des traitements pro-adipogéniques *in vitro* tels que l'AMPc, l'insuline ou les glucocorticoïdes. Leurs expressions sont antérieures à celles de C/EBP α et de PPAR γ 2 et les régulent (Cao et al., 1991; Yeh et al., 1995). En effet, des séquences CCAAT sont présentes au niveau des promoteurs des gènes de C/EBP α et de PPAR γ 2 (Christy et al., 1991; Clarke et al., 1997). La génération de souris invalidées pour C/EBP β et/ou C/EBP δ a permis de montrer que ces facteurs sont importants dans la formation des adipocytes blancs et bruns, la double délétion entraînant une perte de TA plus prononcée (Tanaka et al., 1997). En revanche, C/EBP α est indispensable à la formation du TA blanc *in vivo*, mais pas à celle du TA brun (Linhart et al., 2001). *In vitro*, C/EBP α est incapable de restaurer la différenciation de cellules embryonnaires déficientes pour PPAR γ 2 alors que PPAR γ 2 restaure la différenciation de cellules déficientes pour C/EBP α (Rosen et al., 2002). Bien que PPAR γ 2 soit le régulateur majeur de l'adipogenèse, C/EBP α permet de maintenir son expression et ainsi le bon déroulement de la différenciation terminale. De plus, C/EBP α favorise l'entrée de glucose stimulée par l'insuline dans les adipocytes matures (Wu et al., 1999).

SREBP1c : SREBP1c (ou ADD1, adipocyte differentiation and determination factor 1) appartient à la famille des facteurs de transcription à hélice-boucle-hélice. Son expression est régulée par les C/EBPs (Payne et al., 2009) et son activité est augmentée en l'absence de stérols, qui permet sa translocation nucléaire. Ce facteur porte moyennement bien son nom. En effet, bien que des études *in vitro* aient montré que SREBP1c est important dans le processus d'adipogenèse par des approches de surexpression et de dominant négatif (Kim and Spiegelman, 1996), les études *in vivo* n'ont pas confirmé ce rôle, probablement à cause de la compensation provenant de l'isoforme SREBP2 (Shimano et al., 1997). Néanmoins, SREBP1c joue un rôle important dans l'induction des gènes de la lipogenèse dans les adipocytes tels que la LPL (lipoprotéine lipase), l'acide gras synthase (FAS, fatty acid synthase) ou encore la GPAT (glycerol phosphate acyltransferase) (Kim and Spiegelman, 1996; Ericsson et al., 1997). SREBP1c pourrait également participer au processus d'adipogenèse en augmentant l'expression et l'activité de PPAR γ en se liant directement à son promoteur (Fajas et al., 1999) mais aussi via la production de ligands

lipidiques de PPAR γ , respectivement (Kim et al., 1998). Il est exprimé dans le TA blanc, brun, mais aussi le foie et les muscles.

Autres facteurs : Il existe de nombreux autres facteurs décrits pour leur implication au cours de la différenciation terminale (Rosen et al., 2000; Farmer, 2006). Parmi eux, la famille des protéines à doigt de zinc KLFs (Krüppel-like factors) comprend des membres pro- et anti-adipogéniques qui ont des profils d'expression différents au cours de l'adipogenèse blanche et brune (Brey et al., 2009; Wu and Wang, 2013). Certains régulateurs du cycle cellulaire ont un effet inducteur de l'adipogenèse comme les facteurs E2Fs qui régulent des gènes impliqués dans la différenciation blanche (Bracken et al., 2004; Lefterova and Lazar, 2009), alors que d'autres comme la necdin inhibent la différenciation brune (Tseng et al., 2005). La diminution d'expression de la necdin, nécessaire pour la différenciation brune, est induite notamment par le facteur CREB (cAMP regulatory element-binding protein) (Cypess et al., 2011). CREB induit également l'expression de C/EBP β et PPAR γ 2 (Fox et al., 2006). Plusieurs facteurs sont impliqués dans l'adipogenèse via leur effet inducteur de l'expression de C/EBP β . Les STAT1/3/5A/5B (active signal transducer and activator of transcription) sont également induits au cours de l'adipogenèse et participent à la régulation de l'expression de C/EBP β (Stephens et al., 1996; Zhang et al., 2011). Krox20 (ou Egr2, early growth response gene 2) exerce un effet pro-adipogénique via l'induction de C/EBP β entre autres (Chen et al., 2005). Enfin, il existe des facteurs anti-adipogéniques dont la famille des GATAs (GATA-binding proteins) qui inhibent l'expression de PPAR γ 2 (Tong et al., 2000; Rosen and MacDougald, 2006). Deux membres de la famille des C/EBPs, C/EBP ϵ (ou CHOP) et C/EBP γ , exercent également un effet anti-adipogénique, probablement par leur liaison inhibitrice avec C/EBP β (Rosen and MacDougald, 2006). La diminution d'expression de ces facteurs est observée au cours de la différenciation.

Les facteurs spécifiques de la différenciation brune (Peirce et al., 2014) : Les adipocytes bruns et les myocytes squelettiques ont un précurseur commun chez la souris, positif pour Myf5. La différenciation de ce précurseur en myocyte ou adipocyte brun est contrôlée notamment par le

facteur de transcription PRDM16 (PRD1-BF1-RIZ1 homologous domain containing 16). En effet, la délétion de cette protéine à doigt de zinc induit une diminution des gènes de l'adipocyte brun et une différenciation en myocyte. A l'inverse, la surexpression de PRDM16 dans des myoblastes induit une différenciation en adipocytes bruns (Seale et al., 2008). PRDM16 induit la différenciation brune en formant un complexe avec C/EBP β (Kajimura et al., 2009), PPAR γ et PGC1 α (Seale et al., 2007) et régule l'expression de gènes impliqués dans la thermogenèse (Seale et al., 2011).

PGC1 α (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1- α) est un co-activateur de PPAR γ qui permet l'expression de certains gènes cibles de PPAR γ dont UCP1. Il est plus impliqué dans le maintien des gènes de la thermogenèse et dans la biogenèse mitochondriale (Wu et al., 1999) que dans l'adipogenèse elle-même. L'expression de PGC1 α est négativement régulée par pRB, p107 et p130 qui inhibent la différenciation brune (Gesta et al., 2007). La délétion de pRB dans des cellules progénitrices blanches induit l'expression de gènes des adipocytes bruns (Hansen et al., 2004). L'activité transcriptionnelle de PGC1 α est augmentée par sa phosphorylation par p38MAPK, elle-même régulée par de nombreuses voies de signalisation dont celle de l'AMPc. Cette kinase est nécessaire pour l'adipogenèse blanche (Aouadi et al., 2007) et semble particulièrement importante pour l'adipogenèse brune. En effet, elle est activée par BMP7 (Tseng et al., 2008) et les peptides natriurétiques cardiaques (Bordicchia et al., 2012), et est impliquée dans leurs effets inducteurs de la différenciation adipocytaire brune. L'expression d'UCP1 est contrôlée par d'autres facteurs indépendamment de PGC1 α . Le co-represseur nucléaire RIP140 est fortement exprimé dans le TA blanc et sa délétion entraîne une augmentation de l'expression d'UCP1 dans ce tissu, permettant aux souris d'être résistantes à l'obésité, sans moduler l'adipogenèse elle-même (Leonardsson et al., 2004). LXR β (liver X receptor β) est exprimé dans le TA blanc et brun et inhibe l'expression d'UCP1 par des mécanismes non connus (Hansen and Kristiansen, 2006). Il est à noter que les LXR α et LXR β sont exprimés au cours de la différenciation adipocytaire blanche mais que leurs effets pro- et anti-adipogéniques sont controversés (Ross et al., 2002; Hummasti et al., 2004; Seo et al., 2004).

c) Régulation de l'adipogenèse par le microenvironnement

In vivo, l'adipogenèse est régulée par de nombreux facteurs extracellulaires qui sont produits localement au niveau du microenvironnement du TA ou qui proviennent de la circulation sanguine. En effet, les différents types cellulaires du TA, adipocytes, cellules endothéliales et immunes, sécrètent de nombreuses molécules qui régulent l'adipogenèse. La matrice extracellulaire module également l'adipogenèse. Enfin, certaines hormones comme l'insuline, les stéroïdes ou les hormones thyroïdiennes sont capables d'influencer le devenir des cellules progénitrices. Tout ceci est traité en détails dans la revue « L'adipogenèse des tissus adipeux blancs : influence du microenvironnement », ainsi que les différences observées dans les différents territoires adipeux.

Certaines études suggèrent que les cellules progénitrices des différentes localisations anatomiques possèdent des capacités adipogéniques différentes qui seraient dues à une origine développementale distincte. Cependant, la plupart de ces études ont été réalisées à partir de FSV et ne prennent pas suffisamment en compte les propriétés et effets des cellules du microenvironnement co-cultivées avec les cellules progénitrices. Il est donc primordial d'étudier les cellules progénitrices isolées des différents dépôts adipeux afin de déterminer si ces cellules ont réellement des potentiels différents, et peut-être des origines distinctes, ou si ce sont les cellules du microenvironnement qui régulent ces potentiels.

Revue : « L'adipogenèse des tissus adipeux blancs : influence du microenvironnement »

L'adipogenèse des tissus adipeux blancs : influence du microenvironnement

Adipogenesis in white adipose tissues: influence of the microenvironment

N. Boulet · D. Estève · A. Bouloumié · J. Galitzky

© Springer-Verlag France 2013

Résumé L'adipogenèse, ou la formation d'adipocyte à partir d'une cellule progénitrice, est un processus clé dans le maintien de l'expandabilité du tissu adipeux (TA) sous-cutané, en limitant l'accumulation ectopique de lipides impliquée dans les pathologies associées à l'obésité. Cette revue est axée sur le rôle du microenvironnement du TA dans le contrôle de l'adipogenèse. Les acteurs cellulaires, physiques et moléculaires du microenvironnement sont décrits. Leurs implications dans les disparités d'expansion des TA et leurs contributions aux complications de l'obésité sont abordées.

Mots clés Matrice extracellulaire · Développement embryonnaire · Cellules immunes · Cellules endothéliales · Différences territoriales

Abstract Adipogenesis, or the formation of adipocyte from a progenitor cell, is a key process to maintain subcutaneous adipose tissue (AT) expandability and to limit ectopic lipid accumulation which is implicated in obesity-associated pathologies. This review focuses on the role of AT microenvironment in the control of adipogenesis. The cellular, physical and molecular microenvironment actors are described. Their implications in AT expansion disparities and their contributions to obesity-associated complications are discussed.

Keywords Extracellular matrix (ECM) · Embryonic development · Immune cells · Endothelial cells · Regional differences

Chez l'homme comme chez la souris, deux types de tissus adipeux (TA) existent, le TA blanc et le TA brun. Le TA brun possède la capacité intrinsèque à convertir les substrats énergétiques en chaleur via l'activité spécifique de la protéine découplante mitochondriale UCP1 (Uncoupling Protein 1).

Le TA blanc permet de stocker les acides gras sous forme de triglycérides neutres et de les libérer en fonction des besoins de l'organisme. Outre cette fonction de maintien de l'homéostasie énergétique, le TA possède également une fonction endocrine (sécrétion d'adipokines comme la leptine et l'adiponectine). Chez l'homme adulte, le TA est structuré en lobules adipeux contenant les adipocytes et la fraction stroma-vasculaire (FSV) comprenant des cellules endothéliales, des cellules immunes (macrophages et lymphocytes) et des cellules progénitrices. Ces cellules progénitrices possèdent des capacités adipogéniques et sont à l'origine de la formation de nouveaux adipocytes par le processus d'adipogenèse. Ce processus comprend une étape d'engagement des cellules progénitrices dans la voie de détermination adipocytaire pour former un pré-adipocyte puis une phase de différenciation qui conduit à la formation d'un adipocyte mature et fonctionnel. Les cellules progénitrices permettent ainsi le renouvellement physiologique des adipocytes blancs (10% des adipocytes sont remplacés chaque année chez l'homme) [1]. Chez l'homme adulte, les cellules progénitrices ont été identifiées et caractérisées par l'expression du marqueur CD34 et l'absence de CD31 [2,3]. En revanche, nous ne disposons pas à l'heure actuelle de marqueur des cellules aux différentes étapes de l'adipogenèse et en particulier du pré-adipocyte humain. Lors d'un déséquilibre positif de la balance énergétique, le TA blanc s'accroît et par sa fonction de « tampon » du flux d'acides gras protégerait l'organisme d'un stockage ectopique des lipides dans d'autres organes tels que le muscle et le foie ou le pancréas. L'expansion du TA se déroule en deux phases [4]. La première, dite d'hypertrophie, conduit à une augmentation du volume des adipocytes, suivie d'une seconde dite d'hyperplasie qui correspond à une augmentation de leur nombre. Les adipocytes sont des cellules post-mitotiques qui ne se divisent pas. Ainsi, l'augmentation de leur nombre se fait par la formation de nouveaux adipocytes à partir des cellules progénitrices.

De nombreuses études, majoritairement réalisées chez la souris et à partir de lignées cellulaires murines, ont permis

N. Boulet · D. Estève · A. Bouloumié · J. Galitzky (✉)
INSERM/Université Paul Sabatier UMR1048-I2MC,
Equipe 1, CHU Rangueil, Bâtiment L4, 1, avenue Jean Poulhès,
BP 84225, 31432 Toulouse cedex 4, France
e-mail : jean.galitzky@inserm.fr

de décrypter les mécanismes et les acteurs moléculaires fondamentaux de l'adipogenèse *in vitro*, chez l'adulte. Nous ne reviendrons pas dans cette revue sur les facteurs de transcription impliqués dans l'adipogenèse, les principaux étant peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) et la famille des CCAAT-enhancer-binding proteins (C/EBPs), (pour revues voir [5-8]). De nombreuses interrogations subsistent concernant ce processus d'adipogenèse et seront abordées dans cette revue. Nous nous intéresserons à l'adipogenèse « initiale » qui conduit à la formation et au développement du TA chez l'embryon, puis à l'adipogenèse dans les différents territoires adipeux chez l'adulte (sous-cutané abdominal et glutéo-fémoral, et viscéral). Enfin nous aborderons le rôle du microenvironnement et de ses effets modulateurs sur l'adipogenèse en fonction des différentes localisations anatomiques du TA.

L'adipogenèse au cours du développement embryonnaire

Le développement embryonnaire des TA chez l'homme

Au sein des mammifères, les nouveau-nés humains sont ceux qui possèdent le plus de TA à la naissance [9]. La formation des TA blancs et bruns est étroitement associée à la formation des vaisseaux sanguins spatialement et temporellement [10]. Le TA blanc apparaît dès le deuxième trimestre de grossesse, sans différence selon le sexe du fœtus [11,12]. Des études de microscopie ont permis de déterminer que les premières structures adipeuses, appelées lobules, sont localisées au niveau de la tête et du cou et apparaissent dès la 14^{ème} semaine de grossesse. Par la suite, le TA du tronc se développe suivi par le TA des jambes à la 15^{ème} et 16^{ème} semaine de grossesse respectivement. Entre la 14^{ème} et la 23^{ème} semaine de grossesse, une augmentation importante du nombre de cellules adipeuses a lieu, conduisant à un nombre stable de lobules, qui augmentent ensuite par la taille [12]. Le nombre d'adipocytes est déterminé très tôt mais le TA blanc continue de s'accroître après la naissance par une augmentation de la taille des adipocytes. De nombreuses études suggèrent que le développement du TA du fœtus et du nouveau-né serait modulé par l'obésité, le diabète ou encore l'état nutritionnel de la mère [13,14]. Le nombre d'adipocytes peut également être modifié à la puberté, puis resterait déterminé pour la vie de l'individu à condition que son poids reste stable [1,15,16]. L'accroissement ou la diminution de la masse adipeuse, pour des variations de poids modérées, résulterait alors uniquement de la variation du volume adipocytaire en fonction des apports et des besoins énergétiques de l'individu. Nous aborderons ultérieurement les variations du nombre des adipocytes chez l'adulte dans des situations de prise de poids importante (obésité). Chez le nouveau-né humain,

le TA brun est localisé majoritairement au niveau du cou, en région supra-claviculaire, para-vertébrale et en supra-rénale. Le développement du TA brun a lieu avant celui du TA blanc [12]. Ce TA est bien développé à 5 mois de grossesse [17] et atteint sa taille définitive à la naissance pour régresser ensuite avec l'âge, le sexe (plus conservé chez la femme que chez l'homme) et l'obésité [18,19].

Le développement embryonnaire des TA chez les rongeurs

L'utilisation de modèles de souris transgéniques permettant le suivi du lignage adipocytaire a permis de montrer que l'apparition du TA sous-cutané (SC) inguinal se fait entre le 14^{ème} et le 18^{ème} jour du développement embryonnaire alors que le TA péri-gonadique apparaît après la naissance [20,21]. Les TA blancs SC et retro-péritonéaux ainsi que le TA brun contiennent des adipocytes chargés de lipides dès le premier jour après la naissance. Le développement des TA se poursuit rapidement après la naissance. En revanche, les adipocytes du TA blanc péri-gonadique apparaissent seulement 7 jours après la naissance [22]. Les réseaux sanguin et lymphatique sont présents un jour après la naissance et sont indispensables au développement du TA péri-gonadique. Comme chez l'homme, des études chez le rat suggèrent que le nombre d'adipocytes semble être modulable jusqu'à la maturité sexuelle puis atteindrait un plateau et resterait constant chez l'adulte [23-25]. Le TA brun apparaît tardivement au cours du développement embryonnaire, au 15^{ème} jour. Cependant, son développement et sa maturation se poursuivent à la naissance, et sa fonctionnalité persiste tout au long de la vie de l'animal [26].

Origines embryonnaires des TA

L'origine embryonnaire des TA chez l'homme n'est pas connue. De nombreuses études réalisées chez la souris montrent que les adipocytes blancs et bruns n'ont pas la même origine embryonnaire, les adipocytes bruns présentant une origine commune avec le muscle squelettique [27,28]. Dans les modèles murins, les adipocytes blancs proviennent majoritairement de cellules souches du mésoderme latéral qui sont négatives pour le facteur myogénique Myf5, bien qu'une étude récente révèle une plus grande complexité [29]. Certains adipocytes, notamment de la région cranio-faciale, émergent de la crête neurale [30-32]. Les adipocytes bruns proviennent de cellules souches du mésoderme paraxial qui sont positives pour Myf5 [33].

L'existence d'un troisième type d'adipocyte a récemment été décrite en particulier chez la souris, les adipocytes dits « brite » (brown in white) ou « beige » [34-36]. Ces adipocytes sont présents dans le TA blanc murin, mais possèdent certaines caractéristiques communes avec les adipocytes

bruns (plusieurs vacuoles lipidiques, expression de la protéine UCP1). Les adipocytes beiges apparaissent préférentiellement dans le TA blanc sous-cutané murin après des stimulations au froid, aux agonistes PPAR γ , ou bien aux agonistes des récepteurs β -adrénergiques. Chez l'homme, il a récemment été suggéré que le TA brun pourrait, en fait, être un TA beige [35,37,38]. Bien que l'origine de ces adipocytes ne soit pas connue, il semblerait qu'ils ne proviennent pas du même lignage que les adipocytes bruns [33] mais plutôt d'un progéniteur commun avec les adipocytes blancs ou même d'un progéniteur spécifique [35,39]. Une autre hypothèse propose que ces adipocytes beiges proviendraient de la transdifférenciation des adipocytes blancs [40]. Cette dernière hypothèse vient d'être récemment réfutée dans un travail montrant que les adipocytes beiges, apparaissant après une stimulation au froid, ne proviennent pas d'adipocytes blancs existants mais certainement de la différenciation de cellules progénitrices [20].

L'existence d'une origine embryonnaire différente des différentes localisations adipeuses a été suggérée. En effet, une étude du profil d'expression génique des adipocytes isolés et de la fraction stroma-vasculaire (FSV) murine a révélé des différences d'expression des gènes Hox (Homeobox) impliqués dans le développement [41,42]. Des résultats proches ont été retrouvés chez l'homme à partir de FSV isolées des TA SC abdominal, omental et mésentérique [43] mais aussi à partir d'adipocytes et de FSV isolés des TA SC abdominal et glutéo-fémoral [44]. Cependant, ces études réalisées à partir de FSV totale (comprenant les progéniteurs adipocytaires mais aussi les cellules endothéliales et immunitaires) peuvent entraîner un biais dans les résultats. De plus, il est envisageable que les différents profils d'expression génique des territoires adipeux ne soient pas le reflet d'une origine embryonnaire différente mais celui de progéniteurs adultes présents à des stades différents de l'adipogenèse.

Adipogenèse au cours du développement embryonnaire

Les processus d'adipogenèse des cellules souches permettant la formation des adipocytes chez l'embryon ne sont pas ou peu connus. Certaines études utilisant des invalidations génétiques de facteurs clés de l'adipogenèse, identifiés chez l'adulte *in vitro*, ont permis de montrer leur implication également au cours du développement embryonnaire.

PPAR γ est considéré comme le facteur de transcription clé de l'adipogenèse. Les souris invalidées pour PPAR γ ne présentent pas de TA blanc et brun, et sont protégées de l'obésité induite par un régime gras, confirmant l'implication de ce facteur de transcription dans le développement initial des TA [45,46]. Trois cas de mutations génétiques de PPAR γ chez l'homme ont été rapportés. Ces individus présentent une résistance sévère à l'insuline et ont développé un diabète de type 2 et une hypertension artérielle à des âges

inhabituellement jeunes. En revanche, leur poids corporel et la distribution de leur TA ne semblaient pas altérés [47]. Deux études contradictoires ont montré la même année chez l'homme, que la même mutation de PPAR γ 2, isoforme spécifiquement exprimée dans le TA, était associée à un indice de masse corporelle plus élevé ou plus faible, respectivement [48,49]. Malgré des données différentes et parfois contradictoires, l'ensemble de ces études souligne le rôle de PPAR γ dans le développement du TA et des complications métaboliques associées à l'obésité chez l'homme comme chez la souris.

La famille des C/EBPs, α , β et δ , est étroitement impliquée dans l'adipogenèse avec PPAR γ . Les adipocytes blanc et brun de souris ayant une invalidation de C/EBP α ou de C/EBP β sont incapables d'accumuler des gouttelettes lipidiques, suggérant un rôle de ces facteurs dans la maturation des adipocytes [50,51]. Enfin, la double invalidation de C/EBP β et C/EBP δ est létale à 85% à la naissance. Ces souris ne présentent pas d'accumulation de lipides dans leur TA brun et ont une réduction du TA péri-gonadique, confirmant le rôle de ces facteurs dans l'adipogenèse chez l'embryon [52].

Enfin, la famille des SREBPs (sterol regulatory element binding proteins), 1A, 1C et 2, est impliquée dans la synthèse du cholestérol et dans l'adipogenèse chez l'adulte, particulièrement SREBP1C. La surexpression de SREBP1C dans le TA entraîne des désordres de la différenciation adipocytaire, un phénotype lipodystrophique avec des TA blancs sous-développés, un TA brun surdéveloppé constitué d'adipocytes ressemblant à des adipocytes blancs, et au développement d'une résistance à l'insuline suivi d'un diabète de type 2 [53].

L'adipogenèse chez l'adulte

Les TA SC, abdominal et glutéo-fémoral, et viscéral (omentum) contribuent différemment aux complications métaboliques associées à l'obésité [54-56]. Il est maintenant admis que le développement excessif du TA viscéral est délétère alors que celui des TA SC abdominal et particulièrement glutéo-fémoral, serait protecteur vis-à-vis des pathologies cardio-métaboliques associées à l'obésité [57]. Le TA viscéral se développe avec l'âge, davantage chez les hommes, et est un facteur important et prédictif pour expliquer la différence de risque de développer des pathologies cardiovasculaires entre les hommes et les femmes [58]. Bien que le TA SC abdominal soit globalement considéré comme protecteur, ce TA peut être divisé en deux parties selon leur localisation par rapport à l'aponévrose, le TA SC superficiel et le TA SC profond. La masse de TA SC profond est corrélée avec l'insulino-résistance alors que celle du TA SC superficiel ne l'est pas [59]. De plus, chez des individus

obèses morbides, le TA SC profond présente une inflammation plus importante que le TA superficiel et est associé à des dysfonctions hépatiques [60].

Adipogenèse dans les différents territoires adipeux blancs

Bien que les adipocytes isolés des TA SC et viscéral possèdent des caractéristiques métaboliques différentes [61], le développement du TA dans son ensemble et le mode de développement (hypertrophie et/ou hyperplasie adipocytaire) pourrait jouer un rôle non négligeable dans la contribution des différents dépôts adipeux aux complications métaboliques. Les adipocytes hypertrophiés sont moins sensibles à l'insuline [62]. Malgré des données divergentes, il semblerait que les TA SC abdominal et viscéral ne se développent pas de la même façon, chez la souris et chez l'homme. Chez les rongeurs, le TA SC s'accroît par hyperplasie alors que le TA viscéral (péri-gonadique) s'accroît par hypertrophie après la maturité sexuelle [63,23]. Toutefois, l'inverse a récemment été montré [20]. Chez la femme obèse, le TA SC abdominal semble s'accroître par hypertrophie et par hyperplasie [64]. Selon les études, le TA viscéral s'accroît par hypertrophie [64] ou par hyperplasie [65]. Ces résultats sur le développement du TA restent un peu confus. Lors de prises de poids modérées le TA semble se développer essentiellement par hypertrophie alors qu'une phase hyperplasie est observée avec l'obésité. Chez l'homme, la prise de poids est rarement linéaire, mais résulte de l'alternance de périodes de gain et de perte de poids (effet yoyo) conduisant à une augmentation modérée du nombre d'adipocytes à chaque prise de poids qui pourrait expliquer les difficultés à maintenir un poids stable après une période de régime. Le mode de développement des différents dépôts adipeux varie aussi selon le sexe et l'âge, en particulier chez la femme. A la ménopause, le TA viscéral se développe davantage par hypertrophie, soulignant le rôle des hormones sexuelles dans l'adipogenèse [66]. Lors d'une grossesse, le TA SC glutéo-fémoral se développe précocement par hyperplasie et tardivement par hypertrophie, phénomènes associés à une insulino-sensibilité augmentée en début de grossesse et une insulino-résistance en fin de grossesse [67]. Le TA SC glutéo-fémoral ne se développe pas de la même façon selon le sexe avec l'obésité, son extension se faisant par hyperplasie chez la femme et par hypertrophie chez l'homme [68]. Il convient de noter que l'historique et la dynamique de l'obésité sont rarement pris en compte dans les études, or la phase dans laquelle se trouvent les individus (prise de poids, poids stable, amaigrissement) au moment de l'étude peut être différente et entraîner un biais dans l'interprétation des résultats. Deux études se sont intéressées aux développements des TA après une prise de poids. Une suralimentation de 8 semaines, chez des hommes et des femmes, entraîne un

gain de masse grasse de 1,9 kg dans les parties hautes du corps et de 1,6 kg dans les parties basses du corps, et une hyperplasie du TA glutéo-fémoral et une hypertrophie du TA SC abdominal [69]. Dans une autre étude, la suralimentation de 8 semaines, chez des hommes, entraîne une prise de poids de 2,5 kg, sans modifier la taille et le nombre d'adipocytes dans le TA SC abdominal [70]. De manière intéressante, cette même étude a montré qu'il n'existe pas de relation dans le développement des TA SC abdominal et viscéral. Par contre l'expansion du TA viscéral est plus importante chez les individus dont les capacités de stockage lipidique dans le TA SC abdominal sont le plus altérées [71]. Il est connu que les traitements par des agonistes PPAR γ permettent d'améliorer les paramètres métaboliques des rongeurs (glycémie, sensibilité à l'insuline) tout en augmentant la masse grasse des animaux, par stimulation de l'adipogenèse dans les différents dépôts adipeux SC et viscéraux et la génération de nouveaux petits adipocytes [72-74]. Chez l'homme, les thiazolidinediones (pioglitazone, rosiglitazone) utilisées en traitement du diabète de type 2, améliorent la glycémie et la sensibilité à l'insuline, et modifient la répartition de la masse grasse en augmentant celle du TA SC abdominal mais pas du TA viscéral [75].

Des progéniteurs adipocytaires différents selon les dépôts adipeux ?

L'augmentation de la masse adipeuse par hyperplasie semble dépôt-dépendante, sous-tendant d'éventuelles différences de capacité adipogénique des progéniteurs adipocytaires des divers dépôts adipeux. Cependant, les données de la littérature s'opposent concernant les caractéristiques des progéniteurs adipocytaires des différents dépôts adipeux. Il est à noter que peu d'études sont réalisées à partir de progéniteurs adipocytaires natifs, mais plutôt à partir de FSV comprenant également des cellules immunes et endothéliales. Certaines études soutiennent l'hypothèse selon laquelle les progéniteurs adipocytaires des différents dépôts adipeux ne possèdent pas les mêmes caractéristiques. Chez la souris, la FSV isolée du TA inguinal possède des capacités adipogéniques plus importantes que la FSV isolée du TA péri-gonadique [76]. Chez l'homme, la FSV isolée du TA SC abdominal présente des capacités de prolifération et de différenciation adipocytaire plus élevées que celles du TA mésentérique, du TA omental [77] ou du TA glutéo-fémoral [78]. Ces capacités adipogéniques différentes peuvent s'expliquer par une expression génique du facteur PPAR γ plus élevée dans le TA SC abdominal que viscéral [79]. La FSV isolée de TA SC abdominal superficiel possède de plus grandes capacités adipogéniques que celle du TA SC abdominal profond ainsi que du TA viscéral [80,81]. Alors que les cellules progénitrices isolées du TA SC profond et superficiel présentent des capacités adipogéniques

équivalentes, une différence dans la proportion des autres types cellulaires (et notamment des lymphocytes) pourrait expliquer les disparités observées dans le potentiel adipogénique de la FSV [81]. D'autres montrent que les FSV isolées des TA SC abdominal et viscéral possèdent des capacités adipogéniques équivalentes [82-84] et que les progéniteurs adipocytaires de ces tissus possèdent le même phénotype, la même morphologie, et le même profil d'expression de cytokines [85]. Ces dissemblances dans les données de la littérature sont probablement liées aux modèles expérimentaux utilisés. Il est fréquent que la FSV totale soit considérée comme progéniteurs adipocytaires ou même pré-adipocytes alors que les cellules endothéliales et immunes présentes dans la FSV modulent l'adipogenèse [86,87]. Une nomenclature plus précise du type cellulaire utilisé dans les études permettrait de diminuer la confusion et d'homogénéiser les résultats. Enfin, les variations de capacité adipogénique des différents TA pourraient s'expliquer, non par des origines ou propriétés différentes des cellules progénitrices, mais par un microenvironnement différent selon les dépôts adipeux.

Contrôle de l'adipogenèse par le micro-environnement du tissu adipeux

Les cellules du micro-environnement

Les adipocytes

Les adipocytes sécrètent de nombreuses molécules regroupées sous le nom d'adipokines, dont certaines sont impliquées dans la régulation des processus adipogéniques. La leptine et l'adiponectine sont les deux adipokines les plus étudiées. Ces deux molécules exercent des effets centraux sur la régulation de la prise alimentaire et la dépense énergétique notamment mais également au niveau local sur les adipocytes [88-92]. Leurs sécrétions sont régulées par la taille des adipocytes. La taille des adipocytes du TA SC abdominal est supérieure à celle des adipocytes du TA viscéral [93,94]. La différence de sécrétion de ces adipokines participerait à la différence en termes de potentiel adipogénique de ces deux dépôts adipeux.

La leptine exerce des effets sur les progéniteurs adipocytaires. Plusieurs travaux ont décrit les effets stimulants de la leptine sur la prolifération des cellules de la FSV de rat et humaine, mais son impact sur la différenciation adipocytaire diverge selon les doses ou le modèle cellulaire utilisés [95,96]. Chez l'homme, la leptine semble induire l'adipogenèse *in vitro* cependant les concentrations utilisées sont souvent supra-physiologiques [97].

Les effets de l'adiponectine sur l'adipogenèse ne sont pas clairs. La surexpression de l'adiponectine spécifiquement dans le TA murin entraîne une diminution de la masse grasse

et des niveaux d'ARNm de C/EBP α . *In vitro*, le rôle anti-adipogénique de l'adiponectine a été révélé sur une lignée cellulaire murine ou sur des cellules stromales de la moelle osseuse [98,99]. Cependant, chez la souris, l'administration périphérique d'adiponectine augmente l'expression des protéines découplantes UCP1, 2 et 3 dans le TA brun, le TA blanc et le muscle squelettique respectivement et conduit à une augmentation de l'oxydation des acides gras associée à une diminution de la masse adipeuse [100]. L'ensemble de ces travaux ne permet pas de statuer sur le rôle direct de l'adiponectine sur l'adipogenèse. Enfin les travaux de Fu et al. augmentent la confusion dans ce domaine. En effet, les auteurs ont montré que la surexpression de l'adiponectine dans des cellules préadipocytaires de la lignée 3T3L1 entraîne une augmentation de la prolifération et de la différenciation adipocytaire [101].

Les cellules endothéliales

Outre le rôle joué par les cellules endothéliales dans l'expansion du TA en augmentant la vascularisation nécessaire à ce développement, le lit vasculaire du TA a été proposé depuis quelques années comme source potentielle de cellules progénitrices capables de former des adipocytes. En effet, plusieurs groupes de recherche ont proposé un nouveau concept suggérant que les cellules endothéliales pourraient se différencier pour revenir à un stade de cellules progénitrices, et former par la suite des adipocytes [102-105]. Ce mécanisme a été appelé transition endothélio-mésenchymateuse. Des modèles murins génétiquement modifiés, permettant de suivre le devenir des cellules endothéliales, ont permis de mettre en évidence *in vivo* que certains adipocytes pourraient provenir de cellules ayant exprimé des protéines spécifiques des cellules endothéliales comme la VE-cadhérine ou Tie 2.

D'autres cellules appartenant à la niche vasculaire et situées à la périphérie des vaisseaux et capillaires sanguins ont également été identifiées pour leur capacité adipogénique [106]. La nature de ces cellules n'est pour autant pas clairement déterminée. Certains groupes de recherche définissent ces cellules comme des péricytes compte tenu de leur localisation [107,108] alors que d'autres ne retrouvent pas l'expression des marqueurs péricytaires à la surface des cellules progénitrices périvasculaires [3].

Les cellules immunes

L'obésité est associée à une inflammation de bas bruit. Outre l'élévation de protéines et cytokines inflammatoires au niveau plasmatique (C-reactive protein (CRP), interleukin 6 (IL6)...), une accumulation de cellules immuno-inflammatoires (macrophages, lymphocytes, cellules Natural Killer...) est observée avec l'obésité au sein des différents dépôts adipeux chez l'homme mais également chez la

souris [109,110]. L'accumulation de cellules immunes au sein du TA est associée au développement de désordres métaboliques et plus particulièrement du diabète de type 2 chez l'obèse [111,112]. Récemment les cellules immunes, via les cytokines qu'elles sécrètent, ont été impliquées dans le contrôle des mécanismes d'adipogénèse [113-115]. In vitro, des milieux conditionnés par des macrophages isolés de TA humain ou de lignées humaines et murines entraînent une diminution du potentiel adipogénique des cellules progénitrices du TA [87,116]. Ces données ont conduit au cours de ces dernières années à développer le concept d'expandabilité du TA qui sous-tend que l'inflammation du TA est associée à une diminution de sa plasticité et notamment à sa capacité d'expansion [117-120]. L'augmentation des cellules immunes, comme leurs changements de phénotype au sein des dépôts adipeux, sont certainement dus à l'augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les adipocytes mais aussi par les cellules progénitrices du TA. Les modifications du profil cytokinique dans le microenvironnement du TA ont de nombreuses conséquences sur son développement et sur la genèse de pathologies associées à l'obésité [121]. Avec l'obésité, l'accumulation de macrophages et de lymphocytes ne semble pas être équivalente dans les différents dépôts adipeux, et leurs caractéristiques phénotypiques sont modifiées [112,122,123]. Le TA viscéral contient plus de macrophages et de lymphocytes T que le TA SC abdominal, ce qui pourrait participer à la différence de potentiel adipogénique des deux localisations [86,122,124,125].

La sécrétion de tumor necrosis factor alpha (TNF α) par les cellules immunes du TA (macrophages et lymphocytes) entraîne une diminution de la différenciation adipogénique des cellules progénitrices chez l'homme comme chez la souris. Les souris déficientes pour le TNF α prennent plus de poids en réponse à un régime gras que des souris sauvages. Elles présentent un profil métabolique amélioré et une stéatose hépatique diminuée, suggérant une meilleure prise en charge de l'apport énergétique excédentaire par le TA grâce à une capacité à s'accroître augmentée [126].

L'interféron gamma (IFN γ) a également été décrit comme une cytokine sécrétée par les lymphocytes et impliquée dans le contrôle de l'adipogénèse. Les cellules souches mésenchymateuses traitées in vitro avec de l'IFN γ ont des capacités adipogéniques diminuées. De plus, l'expression de plusieurs facteurs de transcription impliqués dans l'adipogénèse est fortement réduite [127]. De façon intéressante, les souris déficientes pour l'IFN γ ont une prise de poids diminuée et des paramètres métaboliques améliorés par rapport aux souris sauvages nourries en régime riche en graisse [128], ce qui suggère in vivo l'implication de l'IFN γ dans le contrôle de l'adipogénèse.

L'IL17, produite par les lymphocytes de type TH17, a été impliquée dans la régulation de l'adipogénèse. Une accumulation de lymphocytes TH17 est observée avec l'obésité chez

l'homme comme dans les modèles murins d'obésité induite par un régime gras [129,130]. Les souris déficientes pour l'IL17 présentent un développement de leurs dépôts adipeux plus important que des souris sauvages alors que des cellules souches mésenchymateuses pluripotentes de la moelle osseuse traitées avec de l'IL17A ou de l'IL17F recombinante ont des capacités adipogéniques réduites [131]. Cependant l'effet observé in vitro avec ces cytokines sur la différenciation adipocytaire de ces cellules n'est pas retrouvé en utilisant des isoformes différentes de l'IL17 comme l'IL17B, C, D ou E [132]. D'autres molécules sécrétées par les cellules immunes ont également été impliquées dans la dérégulation de l'adipogénèse chez la souris comme IL1 β ou IL6 mais les travaux chez l'homme n'ont pas confirmés ces données [133]. D'autres cytokines de la famille des IL1 ont plus récemment été elles aussi impliquées dans la dérégulation de l'adipogénèse [134].

Récemment une nouvelle communication cellulaire entre les cellules immunes et les préadipocytes impliquant le couple CD40L (CD40 Ligand)-CD40 a été mise en évidence. CD40L est produit par les lymphocytes et les macrophages. Une augmentation plasmatique de CD40L avec l'obésité a été décrite alors que les concentrations plasmatiques de CD40L chez les obèses morbides diminuent fortement après une chirurgie bariatrique, qui a aussi pour conséquence d'améliorer de nombreux paramètres métaboliques [135]. Les adipocytes et les cellules progénitrices du TA possèdent le récepteur CD40 et le traitement des cellules progénitrices par du CD40L augmente leurs capacités adipogéniques [136]. En accord avec ces études in vitro, les souris déficientes pour CD40L comme pour le récepteur CD40 sont moins susceptibles à l'obésité induite par un régime riche en graisse que les souris sauvages [137,138].

Les facteurs physiques régulant l'adipogénèse

La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire du TA, composée essentiellement de fibronectine et de plusieurs formes de collagène, est une composante essentielle du microenvironnement du TA [139]. Elle a un rôle de soutien mais participe également à l'homéostasie du TA. L'accumulation excessive de matrice extracellulaire au sein du TA chez l'homme comme chez la souris est associée au développement de désordres métaboliques [140,141]. De façon intéressante, les cellules progénitrices du TA sécrètent des molécules protéolytiques qui dégradent la matrice extracellulaire afin de permettre l'augmentation de la taille des adipocytes mais également la formation de nouveaux adipocytes. Les ARN messagers des gènes codant pour les métallo-protéases MMP-2, MMP-3, MMP-12, MMP-14, MMP-19, ainsi que TIMP-1 sont plus exprimés dans le TA de souris obèses suggérant la nécessité

d'un remodelage de la matrice extracellulaire pour son extension [142]. Notre groupe a montré que les métalloprotéases MMP2 et MMP9 sont des régulateurs de la différenciation adipocytaire. L'inhibition de ces protéases par des agents pharmacologiques ou par des anticorps neutralisants entraîne la diminution des capacités adipogéniques des cellules progénitrices murines et humaines [143,144]. Les travaux de Chun et al. montrent que les souris déficientes pour la métalloprotéase membranaire MMP14 ne sont pas capables d'accroître leurs dépôts adipeux par des mécanismes d'adipogénèse. De plus, cette métalloprotéase est nécessaire pour permettre une différenciation des cellules progénitrices en adipocytes dans des conditions de culture en 3D mimant l'architecture et la matrice du TA [145]. L'augmentation de la fibrose avec l'obésité confère au TA une rigidité anormale entraînant une augmentation des forces mécaniques au sein du TA qui pourrait limiter l'hypertrophie adipocytaire et les mécanismes d'adipogénèse nécessaires au renouvellement physiologique des adipocytes et à la formation de nouveaux adipocytes nécessaires à l'expansion du TA. De plus, une matrice extracellulaire excessivement dense au niveau du TA pourrait diminuer la communication paracrine des cellules en piégeant les messagers, empêchant ainsi la transduction de signaux et provoquant des troubles de l'homéostasie du TA. Cette fibrose pourrait avoir comme origine l'acquisition par les cellules progénitrices d'un phénotype myofibroblastique stimulé par les macrophages du TA. L'augmentation du nombre de macrophages et/ou de leur activité sécrétoire est associée à une augmentation de la fibrose au sein des dépôts adipeux. Le transforming growth factor beta (TGF β), sécrété par les macrophages, induit la différenciation de cellules progénitrices du TA en cellule de type myofibroblastique exprimant α SMA [146,147]. Enfin, la stimulation de cellules progénitrices par des milieux conditionnés par des macrophages augmente la sécrétion de molécules impliquées dans la formation excessive de protéines de la matrice extracellulaire [148].

L'hypoxie

Dans les modèles murins d'obésité génétique ou induite par un régime gras, mais aussi avec l'obésité chez l'homme, des zones hypoxiques ont été décrites dans le TA [149]. L'apparition de zones d'hypoxie a été démontrée dans les modèles animaux d'obésité, toutefois les données chez l'homme restent controversées et nécessitent des investigations plus approfondies [150]. Il est intéressant de noter que l'augmentation des zones hypoxiques avec l'obésité est associée à une augmentation du facteur de transcription HIF1 α . Cependant, une forme de HIF1 α a été décrite pour être induite de façon indépendante de l'hypoxie par les prostaglandines notamment ou par les prolyl hydroxylases [151,152]. Ce changement dans le microenvironnement du

TA pourrait être imputé à la diminution des cellules endothéliales ou de leur fonctionnalité. De plus, la taille des adipocytes hypertrophiés dans le TA d'individus obèses peut atteindre et dépasser la distance limite de diffusion de l'oxygène. L'hypoxie entraîne l'expression par les adipocytes et les cellules progénitrices de HIF1 α qui modifie le profil cytokinique de ces cellules conduisant au recrutement et au changement phénotypique des cellules immunes dans les dépôts adipeux. De plus, l'hypoxie entraîne une diminution des capacités de stockage du TA conduisant à une augmentation du stress du réticulum endoplasmique et du facteur de transcription CHOP (C/EBP homologous protein) qui lui est associé. Ce facteur, décrit pour être un antagoniste au facteur de transcription nécessaire à l'adipogénèse C/EBP β , est augmenté chez les obèses et peut diminuer le potentiel d'expansion du TA chez l'homme comme chez la souris [153,154].

Micro-ARNs

Les micro-ARNs sont des petits ARN non-codants qui ont été décrits récemment pour jouer un rôle important dans le contrôle de nombreux processus biologiques et notamment dans la différenciation adipocytaire [155]. Le nombre de ces petits ARN impliqués dans l'adipogénèse est en constante expansion du fait de l'évolution des techniques permettant leur détection et leur identification. Pour exemple, le miR143 est décrit pour être augmenté dans les cellules murines 3T3L1 lors de la différenciation adipocytaire [156]. Son inhibition par un oligo-nucléotide antisens dans des cellules progénitrices humaines cultivées en milieu adipogénique diminue l'expression des marqueurs adipocytaires ainsi que l'accumulation de gouttelettes lipidiques [157]. Cependant, de nombreuses études montrant l'impact de ces nouveaux régulateurs sont réalisées sur des modèles cellulaires murins et les résultats sont souvent discordants. Selon les études, miR103 est décrit pour être surexprimé avec la différenciation adipocytaire, soit sous-exprimé dans le TA de souris obèses, ou surexprimé dans le TA SC chez l'homme [157-159]. Des études plus approfondies sur ces nouveaux régulateurs de l'adipogénèse sont nécessaires afin de mieux appréhender le rôle exact joué par les miRNAs dans l'adipogénèse chez l'homme. Même si la régulation des mécanismes adipogéniques par les miRNAs semblent essentiellement « intracrines », ils peuvent également être sécrétés ce qui leur donnent des potentialités d'action paracrine ou endocrine sur le développement des dépôts adipeux qu'il reste à objectiver.

Contrôle de l'adipogénèse par les facteurs systémiques

Certains facteurs systémiques sont capables de réguler l'adipogénèse. Ces facteurs apportés par la circulation au sein des

dépôts adipeux peuvent être transformés par des enzymes produites localement afin de modifier leurs propriétés adipogéniques. Ces enzymes ainsi que les récepteurs de ces facteurs peuvent être différenciellement exprimés en fonction de la localisation anatomique des dépôts adipeux.

Insuline et IGF1

L'insuline et l'Insulin-like Growth Factor 1 (IGF1) stimulent l'adipogénèse [160,161]. L'insuline est utilisée *in vitro* pour induire la différenciation des progéniteurs adipocytaires et de la FSV en adipocytes dans la plupart des travaux. De nombreuses études ont montré l'implication de l'insuline, de son récepteur ou encore des effecteurs intracellulaires de la voie de signalisation de cette hormone dans l'adipogénèse. Les protéines IRS (insulin receptor substrate) sont activées suite à la liaison de l'insuline sur son récepteur ou bien de l'IGF1. L'inactivation du récepteur à l'insuline sur des cellules 3T3L1 inhibe leur capacité de différenciation adipocytaire [162]. De plus, des souris invalidées génétiquement pour le récepteur à l'insuline ont, dès la naissance, une forte diminution de leur TA blanc, résultant surtout d'une diminution du volume des adipocytes mais également d'une baisse modérée du nombre d'adipocytes [163]. L'invalidation génétique de IRS-1 ou de IRS-2, ou bien la double invalidation, inhibe la différenciation adipocytaire de fibroblastes embryonnaires murins de 60%, 15% et 100% respectivement [164]. De même, la double invalidation d'IRS-1 et IRS-3, chez la souris, entraîne une très forte diminution de la quantité de TA, soulignant le rôle de ces protéines dans la formation du TA [165]. Les effets pro-adipogéniques de l'insuline sont médiés, en partie, par la protéine Foxo1 [166] ainsi que CREB (Cyclic AMP Response Element-Binding) [167]. L'IGF1, en se liant au récepteur IR3, induit la prolifération, la différenciation adipocytaire des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse en augmentant l'expression protéique de PPAR γ , ainsi que la lipogénèse [168].

Hormones thyroïdiennes

Dès 1975, une étude épidémiologique indique une association entre l'obésité et l'hypothyroïdisme [169]. A l'inverse, l'hyperthyroïdisme est associé à une perte de poids [170], effet préférentiellement dû aux actions stimulantes des hormones thyroïdiennes sur la dépense énergétique. Cependant, comme l'insuline, la triiodothyronine est utilisée pour induire la différenciation adipocytaire *in vitro*. Plusieurs groupes de recherche ont montré que la triiodothyronine augmente la différenciation adipocytaire des cellules murines 3T3 mais aussi des cellules humaines de la FSV *in vitro* [171,172]. Plus récemment, le rôle pro-adipogénique des hormones thyroïdiennes a été confirmé par des études

d'invalidation des récepteurs aux hormones thyroïdiennes entraînant une diminution de l'adipogénèse [173,174].

Stéroïdes

Les hormones sexuelles ont été décrites pour avoir des effets sur l'adipogénèse. Les androgènes et les œstrogènes possèdent des potentialités pro-proliférantes et anti-différenciantes [175]. Les cellules progénitrices du TA sélectionnées par adhérence au plastique et traitées avec différents androgènes (testostérone, dihydrotestostérone, ou un agoniste pharmacologique des récepteurs aux androgènes) présentent des capacités adipogéniques réduites de façon concentration-dépendante [176]. Il est important de noter que ces effets sont retrouvés sur des cellules isolées à partir de TA d'homme ou de femme, et indépendamment de la localisation du TA. Les enzymes AKR (Aldo-keto reductase) de type AKR1C1, C2, C3 impliquées dans la maturation des androgènes, et produites par les adipocytes, sont plus exprimées dans le TA SC que viscéral. Un traitement par des œstrogènes endogènes du type 17 β Œstradiol entraîne une diminution de la masse grasse chez le rongeur. En accord avec les effets décrits des œstrogènes sur l'adipogénèse, les modèles de rongeurs déficients pour l'aromatase (enzyme responsable de la conversion des androgènes en œstrogènes) ou ovariectomisés présentent un développement exacerbé de leurs dépôts adipeux [177]. Le rôle direct des hormones sexuelles dans la différenciation adipocytaire des cellules progénitrices du TA reste toutefois à élucider. Il est important de noter que les cellules progénitrices expriment les récepteurs aux œstrogènes ER α et ER β ainsi que les récepteurs aux androgènes de façon moins importante que les adipocytes matures et que leur expression augmente durant la différenciation adipocytaire [178].

A l'inverse, les glucocorticoïdes ont été décrits pour leur rôle pro-adipogénique via notamment l'activation de la voie des C/EBPs ou de PPAR γ [179-181]. Plusieurs théories convergent sur l'importance de la balance glucocorticoïdes/hormones sexuelles (androgènes et œstrogènes) dans le contrôle de l'expandabilité du TA via la régulation des mécanismes adipogéniques. Des variations de cette balance pourraient expliquer une partie des différences de potentiel adipogénique dans les différents territoires adipeux. Il est intéressant de noter que la majorité des protocoles de culture cellulaire permettant la différenciation de cellules dans la voie adipogénique nécessitent l'ajout d'un glucocorticoïde. De plus les cellules progénitrices, comme les adipocytes, expriment la 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 1 (11 β -HSD1), permettant la régénération d'une forme biologiquement active de glucocorticoïde (cortisol à partir de cortisone chez l'homme, et corticostérone à partir de déoxycorticostérone chez le rongeur) [182]. L'activité de la 11 β -HSD1 a été décrite pour être plus importante dans le

TA viscéral humain comparé au TA SC [183]. Récemment, les travaux de Lindroos et al. ont identifié un nouveau partenaire moléculaire, LM03, induit par les glucocorticoïdes et dont l'action sur PPAR γ conduit à la stimulation de l'adipogenèse spécifiquement dans le TA viscéral humain [184,185].

Prostaglandines

Les prostaglandines sont des médiateurs lipidiques dérivés de l'acide arachidonique. Ces molécules ont été impliquées dans le contrôle des mécanismes de l'adipogenèse il y a plus de 20 ans [186,187]. La maturation des prostaglandines se fait par des mécanismes complexes, hautement régulés par plusieurs enzymes et conduisant à la formation de différents types de prostaglandines [188]. Cependant, des effets opposés sont observés sur l'adipogenèse selon le type de prostaglandine. Les prostaglandines de type PGI $_2$ (aussi appelées prostacycline) ont des effets pro-adipogéniques en promouvant les phases précoces de l'adipogenèse via l'activation des facteurs de transcriptions C/EBPs et PPAR γ [189]. Le système Rénine-Angiotensine a été impliqué dans la synthèse de PGI $_2$ au niveau du TA. De façon intéressante, le groupe de Ailhaud a montré que l'angiotensine produite par le TA, maturée à partir de l'angiotensinogène, augmente la production de PGI $_2$ [190]. Les prostaglandines de type PGD $_2$ et plus particulièrement leurs métabolites actifs les PGJ $_2$ ont été décrits pour être des ligands potentiels des élé-

ments de réponse à PPAR γ [191,192]. In vitro, des cellules 3T3 traitées par une isoforme de PGJ $_2$ présentent une différenciation adipocytaire augmentée de façon PPAR γ -dépendante mais aussi par une voie indépendante de ce facteur de transcription [193]. De plus, les adipocytes produisent les enzymes nécessaires à la maturation des PGJ $_2$ et la quantité de PGJ $_2$ produite augmente durant la différenciation adipocytaire des 3T3L1. Toutefois les concentrations de métabolites des PGD $_2$ utilisées (de l'ordre du μ M ou nM) dans la majorité des expérimentations in vitro ne sont pas retrouvées in vivo où des concentrations de l'ordre du pM sont mesurées [194]. A l'inverse, les prostaglandines de type PGF $_{2\alpha}$ ou PGE $_2$ ont un effet anti-adipogénique [195,196]. De nombreuses molécules regroupées sous le nom de PGF synthases et PGE synthases respectivement, sont produites au niveau du TA et permettent l'augmentation de la production de ces prostaglandines. Les molécules de la famille des aldo keto réductases (AKR1B3 et AKR1B7 respectivement chez l'homme et chez la souris) ont été identifiées pour leur rôle anti-adipogénique médié par la maturation de PGF $_{2\alpha}$ [197,198].

Conclusion et remarques

Les processus et les facteurs hormonaux, paracrines et physiques (pression partielle en oxygène, matrice extracellulaire) modulant l'adipogenèse sont largement documentés

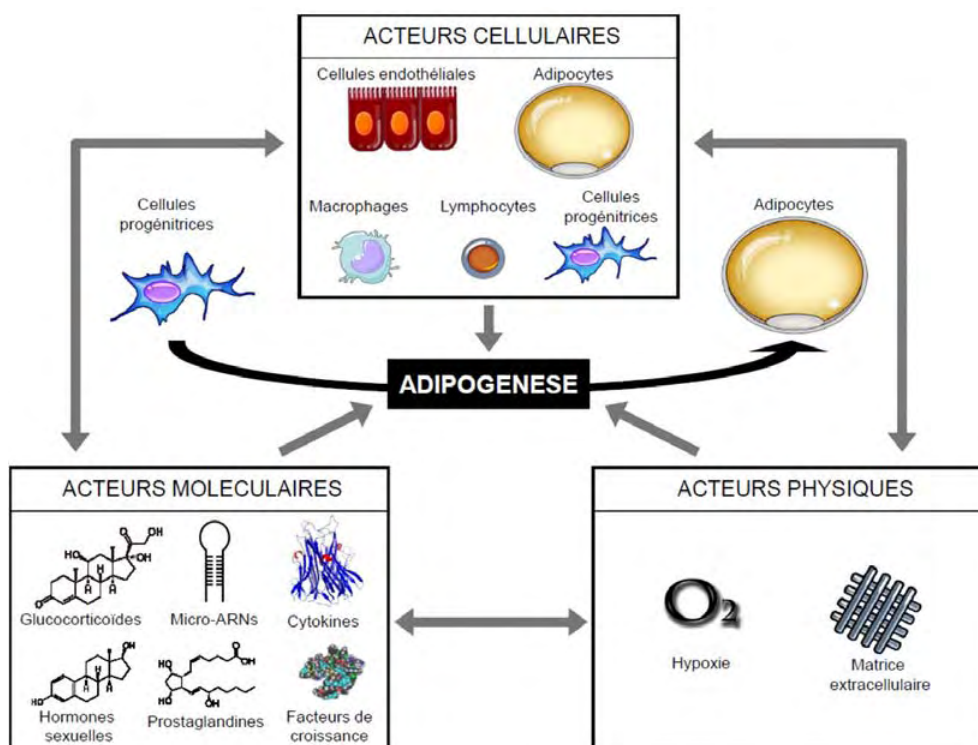


Fig. 1 Modulation de l'adipogenèse par le micro-environnement du tissu adipeux

chez la souris. Cependant la transposition de ces données chez l'homme reste difficile tant au niveau des processus mécanistiques que régulateurs de l'adipogenèse. Les modèles murins d'étude du développement du TA utilisent des approches qui ne reflètent pas la genèse, l'organisation, la distribution et la fonctionnalité des dépôts adipeux humains. Il est néanmoins évident que le processus d'adipogenèse est complexe et probablement sous la dépendance du microenvironnement (Fig. 1) défini par les cellules immunes et leurs phénotypes, les adipocytes et leur niveau d'hypertrophie, les cellules endothéliales et leur fonctionnalité, spécifique de la localisation anatomique du TA considéré. Il est donc nécessaire de prendre en compte l'ensemble des acteurs constituant le microenvironnement afin de mieux comprendre les mécanismes d'adipogenèse pour envisager des stratégies thérapeutiques visant à la moduler de façon localisation spécifique. En effet, maintenir ou rétablir une adipogenèse fonctionnelle pourrait renforcer le rôle tampon protecteur du TA sous-cutané vis-à-vis des effets délétères des lipides dans le contexte de l'obésité et limiter ainsi le développement des pathologies qui lui sont associées.

Références

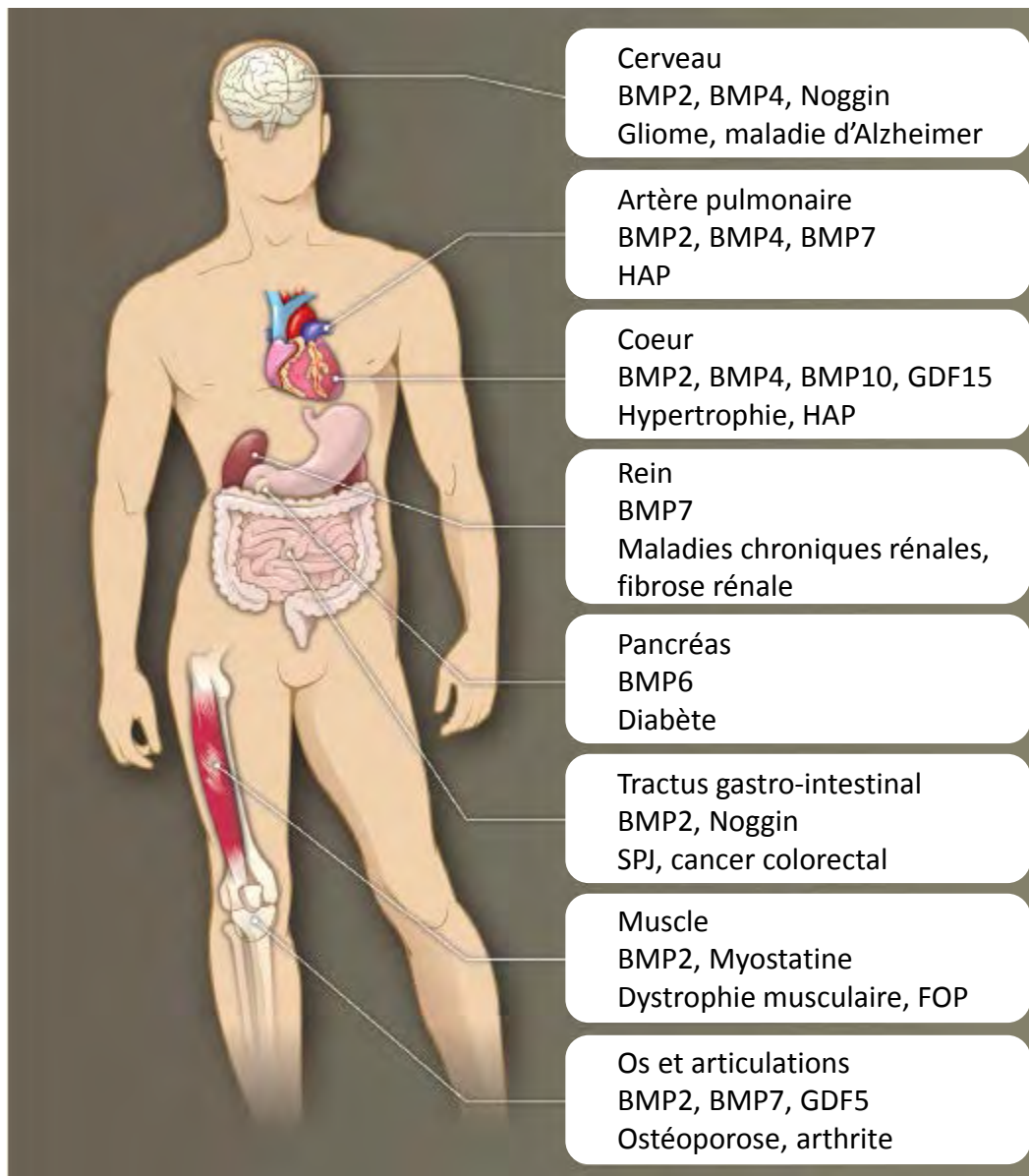
- Spalding KL, Arner E, Westermark PO, et al (2008) Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 453:783–7
- Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, et al (2004) Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* 110:349–55
- Maumus M, Peyrafitte JA, D'Angelo R, et al (2011) Native human adipose stromal cells: localization, morphology and phenotype. *Int J Obes (Lond)* 35:1141–53
- Hirsch J, Batchelor B (1976) Adipose tissue cellularity in human obesity. *Clin Endocrinol Metab* 5:299–311
- Rosen ED, MacDougald OA (2006) Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:885–96
- Leferova MI, Lazar MA (2009) New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 20:107–114
- Cristancho AG, Lazar MA (2011) Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12:722–34
- Tang QQ, Lane MD (2012) Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem* 81:715–36
- Kuzawa CW (1998) Adipose tissue in human infancy and childhood: an evolutionary perspective. *Am J Phys Anthropol Suppl* 27:177–209
- Hausman GJ, Campion DR, Martin RJ (1980) Search for the adipocyte precursor cell and factors that promote its differentiation. *J Lipid Res* 21:657–70
- Poissonnet CM, Burdi AR, Bookstein FL (1983) Growth and development of human adipose tissue during early gestation. *Early Hum Dev* 8:1–11
- Poissonnet CM, Burdi AR, Garn SM (1984) The chronology of adipose tissue appearance and distribution in the human fetus. *Early Hum Dev* 10:1–11
- Hauner H, Brunner S, Amann-Gassner U (2013) The role of dietary fatty acids for early human adipose tissue growth. *Am J Clin Nutr* VOL ?? PAGES??
- Parlee SD, Macdougald OA (2013) Maternal nutrition and risk of obesity in offspring: The Trojan horse of developmental plasticity. *Biochim Biophys Acta* VOL ?? PAGES??
- Knittle JL, Timmers K, Ginsberg-Fellner F, et al (1979) The growth of adipose tissue in children and adolescents. Cross-sectional and longitudinal studies of adipose cell number and size. *J Clin Invest* 63:239–46
- Knittle JL, Ginsberg-Fellner F, Brown RE (1977) Adipose tissue development in man. *Am J Clin Nutr* 30:762–6
- Merklin RJ (1974) Growth and distribution of human fetal brown fat. *Anat Rec* 178:637–45
- Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B (2011) Three years with adult human brown adipose tissue. *Ann N Y Acad Sci* 1212: E20–36
- Cypess AM, Lehman S, Williams G, et al (2009) Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* 360:1509–17
- Wang QA, Tao C, Gupta RK, et al (2013) Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat Med* 19:1338–44
- Birsoy K, Berry R, Wang T, et al (2011) Analysis of gene networks in white adipose tissue development reveals a role for ETS2 in adipogenesis. *Development* 138:4709–19
- Han J, Lee JE, Jin J, et al (2011) The spatiotemporal development of adipose tissue. *Development* 138:5027–37
- Greenwood MR, Hirsch J (1974) Postnatal development of adipocyte cellularity in the normal rat. *J Lipid Res* 15:474–83
- Hirsch J, Han PW (1969) Cellularity of rat adipose tissue: effects of growth, starvation, and obesity. *J Lipid Res* 10:77–82
- Johnson PR, Zucker LM, Cruce JA, et al (1971) Cellularity of adipose depots in the genetically obese Zucker rat. *J Lipid Res* 12:706–14
- Schulz TJ, Tseng YH (2013) Brown adipose tissue: development, metabolism and beyond. *Biochem J* 453:167–78
- Atit R, Sgaier SK, Mohamed OA, et al (2006) Beta-catenin activation is necessary and sufficient to specify the dorsal dermal fate in the mouse. *Dev Biol* 296:164–76
- Timmons JA, Wennmalm K, Larsson O, et al (2007) Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:4401–6
- Sanchez-Gurmaches J, Hung CM, Sparks CA, et al (2012) PTEN loss in the Myf5 lineage redistributes body fat and reveals subsets of white adipocytes that arise from Myf5 precursors. *Cell Metab* 16:348–62
- Billon N, Jolicœur C, Raff M (2006) Generation and characterization of oligodendrocytes from lineage-selectable embryonic stem cells in vitro. *Methods Mol Biol* 330:15–32
- Takashima Y, Era T, Nakao K, et al (2007) Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell* 129:1377–88
- Billon N, Iannarelli P, Monteiro MC, et al (2007) The generation of adipocytes by the neural crest. *Development* 134:2283–92
- Seale P, Bjork B, Yang W, et al (2008) PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* 454:961–7
- Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG, et al (2010) Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARGamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem* 285:7153–64
- Wu J, Bostrom P, Sparks LM, et al (2012) Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 150:366–76

36. Schulz TJ, Huang TL, Tran TT, et al (2011) Identification of inducible brown adipocyte progenitors residing in skeletal muscle and white fat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:143–8
37. Lidell ME, Betz MJ, Dahlqvist Leinhard O, et al (2013) Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. *Nat Med* 19:631–4
38. Sharp LZ, Shinoda K, Ohno H, et al (2012) Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. *PLoS One* 7:e49452
39. Cannon B, Nedergaard J (2012) Cell biology: Neither brown nor white. *Nature* 488:286–7
40. Cinti S (2011) Between brown and white: novel aspects of adipocyte differentiation. *Ann Med* 43:104–15
41. Gesta S, Bluher M, Yamamoto Y, et al (2006) Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:6676–81
42. Liu W, Shan T, Yang X, et al (2013) A heterogeneous lineage origin underlies the phenotypic and molecular differences of white and beige adipocytes. *J Cell Sci* 126:3527–32
43. Tchkonina T, Lenburg M, Thomou T, et al (2007) Identification of depot-specific human fat cell progenitors through distinct expression profiles and developmental gene patterns. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292:E298–307
44. Karastergiou K, Fried SK, Xie H, et al (2012) Distinct developmental signatures of human abdominal and gluteal subcutaneous adipose tissue depots. *J Clin Endocrinol Metab* 98:362–71
45. Jones JR, Barrick C, Kim KA, et al (2005) Deletion of PPAR-gamma in adipose tissues of mice protects against high fat diet-induced obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:6207–12
46. Barak Y, Nelson MC, Ong ES, et al (1999) PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* 4:585–95
47. Barroso I, Gurnell M, Crowley VE, et al (1999) Dominant negative mutations in human PPARgamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature* 402:880–3
48. Beamer BA, Yen CJ, Andersen RE, et al (1998) Association of the Pro12Ala variant in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene with obesity in two Caucasian populations. *Diabetes* 47:1806–8
49. Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, et al (1998) A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat Genet* 20:284–7
50. Wang ND, Finegold MJ, Bradley A, et al (1995) Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science* 269:1108–12
51. Millward CA, Heaney JD, Sinasac DS, et al (2007) Mice with a deletion in the gene for CCAAT/enhancer-binding protein beta are protected against diet-induced obesity. *Diabetes* 56:161–7
52. Tanaka T, Yoshida N, Kishimoto T, et al (1997) Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *Embo J* 16:7432–43
53. Shimomura I, Hammer RE, Richardson JA, et al (1998) Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: model for congenital generalized lipodystrophy. *Genes Dev* 12:3182–94
54. Bjorntorp P (1990) “Portal” adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes. *Arteriosclerosis* 10:493–6
55. Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, et al (2001) A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science* 294:2166–70
56. Jensen MD, Haymond MW, Rizza RA, et al (1989) Influence of body fat distribution on free fatty acid metabolism in obesity. *J Clin Invest* 83:1168–73
57. Manolopoulos KN, Karpe F, Frayn KN (2010) Gluteofemoral body fat as a determinant of metabolic health. *Int J Obes (Lond)* 34:949–59
58. Lemieux S, Despres JP, Moorjani S, et al (1994) Are gender differences in cardiovascular disease risk factors explained by the level of visceral adipose tissue? *Diabetologia* 37:757–64
59. Kelley DE, Thaete FL, Troost F, et al (2000) Subdivisions of subcutaneous abdominal adipose tissue and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278:E941–8
60. Tordjman J, Divoux A, Prifti E, et al (2012) Structural and inflammatory heterogeneity in subcutaneous adipose tissue: relation with liver histopathology in morbid obesity. *J Hepatol* 56:1152–8
61. Montague CT, Prins JB, Sanders L, et al (1998) Depot-related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes. *Diabetes* 47:1384–91
62. Livingston JN, Cuatrecasas P, Lockwood DH (1972) Insulin insensitivity of large fat cells. *Science* 177:626–8
63. Joe AW, Yi L, Even Y, et al (2009) Depot-specific differences in adipogenic progenitor abundance and proliferative response to high-fat diet. *Stem Cells* 27:2563–70
64. Drolet R, Richard C, Sniderman AD, et al (2008) Hypertrophy and hyperplasia of abdominal adipose tissues in women. *Int J Obes (Lond)* 32:283–91
65. Amer P, Andersson DP, Thorne A, et al (2013) Variations in the size of the major omentum are primarily determined by fat cell number. *J Clin Endocrinol Metab* 98:E897–901
66. Tchernof A, Labrie F (2004) Dehydroepiandrosterone, obesity and cardiovascular disease risk: a review of human studies. *Eur J Endocrinol* 151:1–14
67. Resi V, Basu S, Haghiac M, et al (2012) Molecular inflammation and adipose tissue matrix remodeling precede physiological adaptations to pregnancy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303:E832–40
68. Tchoukalova YD, Koutsari C, Karpayk MV, et al (2008) Subcutaneous adipocyte size and body fat distribution. *Am J Clin Nutr* 87:56–63
69. Tchoukalova YD, Votruba SB, Tchkonina T, et al (2010) Regional differences in cellular mechanisms of adipose tissue gain with overfeeding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:18226–31
70. Alligier M, Meugnier E, Debard C, et al (2012) Subcutaneous adipose tissue remodeling during the initial phase of weight gain induced by overfeeding in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 97:E183–92
71. Alligier M, Gabert L, Meugnier E, et al (2013) Visceral fat accumulation during lipid overfeeding is related to subcutaneous adipose tissue characteristics in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab* 98:802–10
72. Spiegelman BM (1998) PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* 47:507–14
73. Hallakou S, Doare L, Fougelle F, et al (1997) Pioglitazone induces in vivo adipocyte differentiation in the obese Zucker fa/fa rat. *Diabetes* 46:1393–9
74. Kim JY, van de Wall E, Laplante M, et al (2007) Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J Clin Invest* 117:2621–37
75. Miyazaki Y, Mahankali A, Matsuda M, et al (2002) Effect of pioglitazone on abdominal fat distribution and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2784–91
76. Macotela Y, Emanuelli B, Mori MA, et al (2012) Intrinsic differences in adipocyte precursor cells from different white fat depots. *Diabetes* 61:1691–9
77. Tchkonina T, Giorgadze N, Pirtskhalava T, et al (2006) Fat depot-specific characteristics are retained in strains derived from single human preadipocytes. *Diabetes* 55:2571–8
78. Tchoukalova YD, Koutsari C, Votruba SB, et al (2010) Sex- and depot-dependent differences in adipogenesis in normal-weight humans. *Obesity (Silver Spring)* 18:1875–80

79. Lefebvre AM, Laville M, Vega N, et al (1998) Depot-specific differences in adipose tissue gene expression in lean and obese subjects. *Diabetes* 47:98–103
80. Walker GE, Marzullo P, Verti B, et al (2008) Subcutaneous abdominal adipose tissue subcompartments: potential role in rosiglitazone effects. *Obesity (Silver Spring)* 16:1983–91
81. Boulet N, Esteve D, Bouloumie A, et al (2012) Cellular heterogeneity in superficial and deep subcutaneous adipose tissues in overweight patients. *J Physiol Biochem* 69:575–83
82. Van Harmelen V, Rohrig K, Hauner H (2004) Comparison of proliferation and differentiation capacity of human adipocyte precursor cells from the omental and subcutaneous adipose tissue depot of obese subjects. *Metabolism* 53:632–7
83. Shahparaki A, Grunder L, Sorisky A (2002) Comparison of human abdominal subcutaneous versus omental preadipocyte differentiation in primary culture. *Metabolism* 51:1211–5
84. van Harmelen V, Dicker A, Ryden M, et al (2002) Increased lipolysis and decreased leptin production by human omental as compared with subcutaneous preadipocytes. *Diabetes* 51:2029–36
85. Baglioni S, Francalanci M, Squecco R, et al (2009) Characterization of human adult stem-cell populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue. *Faseb J* 23:3494–3505
86. Duffaut C, Zakaroff-Girard A, Bourlier V, et al (2009) Interplay between human adipocytes and T lymphocytes in obesity: CCL20 as an adipokine and T lymphocytes as lipogenic modulators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29:1608–14
87. Bourlier V, Zakaroff-Girard A, Miranville A, et al (2008) Remodeling phenotype of human subcutaneous adipose tissue macrophages. *Circulation* 117:806–15
88. Fruhbeck G, Aguado M, Gomez-Ambrosi J, et al (1998) Lipolytic effect of in vivo leptin administration on adipocytes of lean and ob/ob mice, but not db/db mice. *Biochem Biophys Res Commun* 250:99–102
89. Fruhbeck G, Aguado M, Martinez JA (1997) In vitro lipolytic effect of leptin on mouse adipocytes: evidence for a possible autocrine/paracrine role of leptin. *Biochem Biophys Res Commun* 240:590–4
90. Bai Y, Zhang S, Kim KS, et al (1996) Obese gene expression alters the ability of 30A5 preadipocytes to respond to lipogenic hormones. *J Biol Chem* 271:13939–42
91. Harris RB (1998) Acute and chronic effects of leptin on glucose utilization in lean mice. *Biochem Biophys Res Commun* 245:502–9
92. Zhang HH, Kumar S, Barnett AH, et al (1999) Intrinsic site-specific differences in the expression of leptin in human adipocytes and its autocrine effects on glucose uptake. *J Clin Endocrinol Metab* 84:2550–6
93. Tchernof A, Belanger C, Morisset AS, et al (2006) Regional differences in adipose tissue metabolism in women: minor effect of obesity and body fat distribution. *Diabetes* 55:1353–60
94. Reynisdottir S, Dauzats M, Thorne A, et al (1997) Comparison of hormone-sensitive lipase activity in visceral and subcutaneous human adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 82:4162–6
95. Machinal-Quelin F, Dieudonne MN, Leneuve MC, et al (2002) Preadipogenic effect of leptin on rat preadipocytes in vitro: activation of MAPK and STAT3 signaling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* 282:C853–63
96. Wagoner B, Hausman DB, Harris RB (2006) Direct and indirect effects of leptin on preadipocyte proliferation and differentiation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290:R1557–64
97. Aprath-Husmann I, Rohrig K, Gottschling-Zeller H, et al (2001) Effects of leptin on the differentiation and metabolism of human adipocytes. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25:1465–70
98. Bauche IB, El Mkaed SA, Pottier AM, et al (2007) Overexpression of adiponectin targeted to adipose tissue in transgenic mice: impaired adipocyte differentiation. *Endocrinology* 148:1539–49
99. Yokota T, Meka CS, Medina KL, et al (2002) Paracrine regulation of fat cell formation in bone marrow cultures via adiponectin and prostaglandins. *J Clin Invest* 109:1303–10
100. Masaki T, Chiba S, Yasuda T, et al (2003) Peripheral, but not central, administration of adiponectin reduces visceral adiposity and upregulates the expression of uncoupling protein in agouti yellow (Ay/a) obese mice. *Diabetes* 52:2266–73
101. Fu Y, Luo N, Klein RL, et al (2005) Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *J Lipid Res* 46:1369–79
102. Medici D, Shore EM, Lounev VY, et al (2010) Conversion of vascular endothelial cells into multipotent stem-like cells. *Nat Med* 16:1400–6
103. Tran KV, Gealekman O, Frontini A, et al (2012) The vascular endothelium of the adipose tissue gives rise to both white and brown fat cells. *Cell Metab* 15:222–9
104. Gupta RK, Mepani RJ, Kleiner S, et al (2012) Zfp423 expression identifies committed preadipocytes and localizes to adipose endothelial and perivascular cells. *Cell Metab* 15:230–9
105. Frontini A, Giordano A, Cinti S (2012) Endothelial cells of adipose tissues: a niche of adipogenesis. *Cell Cycle* 11:2765–6
106. Tang W, Zeve D, Suh JM, et al (2008) White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science* 322:583–6
107. Crisan M, Yap S, Casteilla L, et al (2008) A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 3:301–13
108. Crisan M, Chen CW, Corselli M, et al (2009) Perivascular multipotent progenitor cells in human organs. *Ann N Y Acad Sci* 1176:118–23
109. Weisberg SP, McCann D, Desai M, et al (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112:1796–1808
110. Anderson EK, Gutierrez DA, Hasty AH (2010) Adipose tissue recruitment of leukocytes. *Curr Opin Lipidol* 21:172–7
111. Xu H, Barnes GT, Yang Q, et al (2003) Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112:1821–30
112. Kintscher U, Hartge M, Hess K, et al (2008) T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:1304–10
113. Lacasa D, Taleb S, Keophiphath M, et al (2007) Macrophage-secreted factors impair human adipogenesis: involvement of proinflammatory state in preadipocytes. *Endocrinology* 148: 868–77
114. Maumus M, Sengenès C, Decaunes P, et al (2008) Evidence of in situ proliferation of adult adipose tissue-derived progenitor cells: influence of fat mass microenvironment and growth. *J Clin Endocrinol Metab* 93:4098–4106
115. Couturier J, Patel SG, Iyer D, et al (2010) Human monocytes accelerate proliferation and blunt differentiation of preadipocytes in association with suppression of C/EBP α mRNA. *Obesity (Silver Spring)* 20:253–62
116. Ide J, Gagnon A, Molgat AS, et al (2011) Macrophage-conditioned medium inhibits the activation of cyclin-dependent kinase 2 by adipogenic inducers in 3T3-L1 preadipocytes. *J Cell Physiol* 226:2297–2306
117. Gray SL, Nora ED, Grosse J, et al (2006) Leptin deficiency unmasks the deleterious effects of impaired peroxisome proliferator-activated receptor gamma function (P465L PPAR γ) in mice. *Diabetes* 55:2669–77
118. Sethi JK, Vidal-Puig AJ (2007) Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J Lipid Res* 48:1253–62
119. Isakson P, Hammarstedt A, Gustafson B, et al (2009) Impaired preadipocyte differentiation in human abdominal obesity: role of

- Wnt, tumor necrosis factor- α , and inflammation. *Diabetes* 58:1550–7
120. Gustafson B, Smith U (2006) Cytokines promote Wnt signaling and inflammation and impair the normal differentiation and lipid accumulation in 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem* 281:9507–16
 121. Winer S, Chan Y, Paltser G, et al (2009) Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med* 15:921–9
 122. Duffaut C, Galitzky J, Lafontan M, et al (2009) Unexpected trafficking of immune cells within the adipose tissue during the onset of obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 384:482–5
 123. Zeyda M, Huber J, Prager G, et al (2010) Inflammation correlates with markers of T-cell subsets including regulatory T cells in adipose tissue from obese patients. *Obesity (Silver Spring)* 19:743–8
 124. Curat CA, Miranville A, Sengenès C, et al (2004) From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes* 53:1285–92
 125. O'Rourke RW, Metcalf MD, White AE, et al (2009) Depot-specific differences in inflammatory mediators and a role for NK cells and IFN- γ in inflammation in human adipose tissue. *Int J Obes (Lond)* 33:978–990
 126. Salles J, Tardif N, Landrier JF, et al (2012) TNF α gene knockout differentially affects lipid deposition in liver and skeletal muscle of high-fat-diet mice. *J Nutr Biochem* 23:1685–93
 127. Vidal C, Bermeo S, Li W, et al (2012) Interferon γ inhibits adipogenesis in vitro and prevents marrow fat infiltration in oophorectomized mice. *Stem Cells* 30:1042–8
 128. Wong N, Fam BC, Cempako GR, et al (2012) Deficiency in interferon- γ results in reduced body weight and better glucose tolerance in mice. *Endocrinology* 152:3690–9
 129. Bertola A, Ciucci T, Rousseau D, et al (2012) Identification of adipose tissue dendritic cells correlated with obesity-associated insulin-resistance and inducing Th17 responses in mice and patients. *Diabetes* 61:2238–47
 130. Winer S, Paltser G, Chan Y, et al (2009) Obesity predisposes to Th17 bias. *Eur J Immunol* 39:2629–2635
 131. Zuniga LA, Shen WJ, Joyce-Shaikh B, et al (2010) IL-17 regulates adipogenesis, glucose homeostasis, and obesity. *J Immunol* 185:6947–59
 132. Shin JH, Shin DW, Noh M (2009) Interleukin-17A inhibits adipocyte differentiation in human mesenchymal stem cells and regulates pro-inflammatory responses in adipocytes. *Biochem Pharmacol* 77:1835–44
 133. Gagnon A, Foster C, Landry A, et al (2013) The role of interleukin 1 β in the anti-adipogenic action of macrophages on human preadipocytes. *J Endocrinol* 217:197–206
 134. van Asseldonk EJ, Stienstra R, Koenen TB, et al (2010) The effect of the interleukin-1 cytokine family members IL-1F6 and IL-1F8 on adipocyte differentiation. *Obesity (Silver Spring)* 18:2234–6
 135. Baena-Fustegueras JA, Pardina E, Balada E, et al (2013) Soluble CD40 ligand in morbidly obese patients: effect of body mass index on recovery to normal levels after gastric bypass surgery. *JAMA Surg* 148:151–6
 136. Missiou A, Wolf D, Platzer I, et al (2010) CD40L induces inflammation and adipogenesis in adipose cells—a potential link between metabolic and cardiovascular disease. *Thromb Haemost* 103:788–96
 137. Poggi M, Engel D, Christ A, et al (2011) CD40L deficiency ameliorates adipose tissue inflammation and metabolic manifestations of obesity in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31:2251–60
 138. Guo CA, Kogan S, Amano SU, et al (2013) CD40 deficiency in mice exacerbates obesity-induced adipose tissue inflammation, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 304:E951–63
 139. Napolitano L (1963) The Differentiation of White Adipose Cells. An Electron Microscope Study. *J Cell Biol* 18:663–79
 140. Khan T, Muise ES, Iyengar P, et al (2009) Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI. *Mol Cell Biol* 29:1575–91
 141. Mejhert N, Wilfling F, Esteve D, et al (2013) Semaphorin 3C is a novel adipokine linked to extracellular matrix composition. *Diabetologia* 56:1792–1801
 142. Chavey C, Mari B, Montheuol MN, et al (2003) Matrix metalloproteinases are differentially expressed in adipose tissue during obesity and modulate adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 278:11888–896
 143. Bouloumie A, Sengenès C, Portolan G, et al (2001) Adipocyte produces matrix metalloproteinases 2 and 9: involvement in adipose differentiation. *Diabetes* 50:2080–6
 144. Bourlier V, Zakaroff-Girard A, De Barros S, et al (2005) Protease inhibitor treatments reveal specific involvement of matrix metalloproteinase-9 in human adipocyte differentiation. *J Pharmacol Exp Ther* 312:1272–9
 145. Chun TH, Hotary KB, Sabeh F, et al (2006) A pericellular collagenase directs the 3-dimensional development of white adipose tissue. *Cell* 125:577–91
 146. Bourlier V, Sengenès C, Zakaroff-Girard A, et al (2012) TGF β family members are key mediators in the induction of myofibroblast phenotype of human adipose tissue progenitor cells by macrophages. *PLoS One* 7:e31274
 147. Zaragosi LE, Wdziekonski B, Villageois P, et al (2010) Activin a plays a critical role in proliferation and differentiation of human adipose progenitors. *Diabetes* 59:2513–21
 148. Keophipath M, Achard V, Henegar C, et al (2009) Macrophage-secreted factors promote a profibrotic phenotype in human preadipocytes. *Mol Endocrinol* 23:11–24
 149. Trayhurn P (2013) Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. *Physiol Rev* 93:1–21
 150. Goossens GH, Blaak EE (2012) Adipose tissue oxygen tension: implications for chronic metabolic and inflammatory diseases. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 15:539–46
 151. Liu L, Clipstone NA (2008) Prostaglandin F2 α induces the normoxic activation of the hypoxia-inducible factor-1 transcription factor in differentiating 3T3-L1 preadipocytes: Potential role in the regulation of adipogenesis. *J Cell Biochem* 105:89–98
 152. Floyd ZE, Kilroy G, Wu X, et al (2007) Effects of prolyl hydroxylase inhibitors on adipogenesis and hypoxia inducible factor 1 α levels under normoxic conditions. *J Cell Biochem* 101:1545–57
 153. Tang QQ, Lane MD (2000) Role of C/EBP homologous protein (CHOP-10) in the programmed activation of CCAAT/enhancer-binding protein- β during adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:12446–450
 154. Ariyama Y, Shimizu H, Satoh T, et al (2007) Chop-deficient mice showed increased adiposity but no glucose intolerance. *Obesity (Silver Spring)* 15:1647–56
 155. McGregor RA, Choi MS (2011) microRNAs in the regulation of adipogenesis and obesity. *Curr Mol Med* 11:304–16
 156. Kajimoto K, Naraba H, Iwai N (2006) MicroRNA and 3T3-L1 pre-adipocyte differentiation. *Rna* 12:1626–32
 157. Esau C, Kang X, Peralta E, et al (2004) MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 279:52361–5
 158. Xie H, Lim B, Lodish HF (2009) MicroRNAs induced during adipogenesis that accelerate fat cell development are downregulated in obesity. *Diabetes* 58:1050–7
 159. Ortega FJ, Moreno-Navarrete JM, Pardo G, et al (2010) MiRNA expression profile of human subcutaneous adipose and during adipocyte differentiation. *PLoS One* 5:e9022

160. Smith PJ, Wise LS, Berkowitz R, et al (1988) Insulin-like growth factor-I is an essential regulator of the differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 263:9402–8
161. Gagnon A, Sorisky A (1998) The effect of glucose concentration on insulin-induced 3T3-L1 adipose cell differentiation. *Obes Res* 6:157–63
162. Accili D, Taylor SI (1991) Targeted inactivation of the insulin receptor gene in mouse 3T3-L1 fibroblasts via homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:4708–12
163. Cinti S, Eberbach S, Castellucci M, et al (1998) Lack of insulin receptors affects the formation of white adipose tissue in mice. A morphometric and ultrastructural analysis. *Diabetologia* 41:171–7
164. Miki H, Yamauchi T, Suzuki R, et al (2001) Essential role of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 in adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol* 21:2521–32
165. Laustsen PG, Michael MD, Crute BE, et al (2002) Lipotrophic diabetes in *Irs1(-)/Irs3(-)* double knockout mice. *Genes Dev* 16:3213–22
166. Nakae J, Kitamura T, Kitamura Y, et al (2003) The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. *Dev Cell* 4:119–29
167. Klemm DJ, Leitner JW, Watson P, et al (2001) Insulin-induced adipocyte differentiation. Activation of CREB rescues adipogenesis from the arrest caused by inhibition of prenylation. *J Biol Chem* 276:28430–5
168. Scavo LM, Karas M, Murray M, et al (2004) Insulin-like growth factor-I stimulates both cell growth and lipogenesis during differentiation of human mesenchymal stem cells into adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 89:3543–53
169. Rimm AA, Werner LH, Yserloo BV, et al (1975) Relationship of obesity and disease in 73,532 weight-conscious women. *Public Health Rep* 90:44–51
170. Ritz P, Dumas JF, Salle A, et al (2002) [Thyroid hormones and obesity]. *Ann Endocrinol (Paris)* 63:135–9
171. Flores-Delgado G, Marsch-Moreno M, Kuri-Harcuch W (1987) Thyroid hormone stimulates adipocyte differentiation of 3T3 cells. *Mol Cell Biochem* 76:35–43
172. Hauner H, Entenmann G, Wabitsch M, et al (1989) Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest* 84:1663–70
173. Mishra A, Zhu XG, Ge K, et al (2010) Adipogenesis is differentially impaired by thyroid hormone receptor mutant isoforms. *J Mol Endocrinol* 44:247–55
174. Ying H, Araki O, Furuya F, et al (2007) Impaired adipogenesis caused by a mutated thyroid hormone alpha1 receptor. *Mol Cell Biol* 27:2359–71
175. Gupta V, Bhasin S, Guo W, et al (2008) Effects of dihydrotestosterone on differentiation and proliferation of human mesenchymal stem cells and preadipocytes. *Mol Cell Endocrinol* 296:32–40
176. Blouin K, Nadeau M, Perreault M, et al (2010) Effects of androgens on adipocyte differentiation and adipose tissue explant metabolism in men and women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 72:176–88
177. Chen JQ, Brown TR, Russo J (2009) Regulation of energy metabolism pathways by estrogens and estrogenic chemicals and potential implications in obesity associated with increased exposure to endocrine disruptors. *Biochim Biophys Acta* 1793:1128–43
178. Dieudonne MN, Leneuve MC, Giudicelli Y, et al (2004) Evidence for functional estrogen receptors alpha and beta in human adipose cells: regional specificities and regulation by estrogens. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:C655–61
179. Cao Z, Umek RM, McKnight SL (1991) Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev* 5:1538–52
180. Wu Z, Bucher NL, Farmer SR (1996) Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids. *Mol Cell Biol* 16:4128–36
181. MacDougald OA, Mandrup S (2002) Adipogenesis: forces that tip the scales. *Trends Endocrinol Metab* 13:5–11
182. Napolitano A, Voice MW, Edwards CR, et al (1998) 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 in adipocytes: expression is differentiation-dependent and hormonally regulated. *J Steroid Biochem Mol Biol* 64:251–60
183. Bujalska IJ, Kumar S, Stewart PM (1997) Does central obesity reflect “Cushing’s disease of the omentum”? *Lancet* 349:1210–3
184. Galitzky J, Bouloumie A (2013) Human visceral-fat-specific glucocorticoid tuning of adipogenesis. *Cell Metab* 18:3–5
185. Lindroos J, Husa J, Mitterer G, et al (2013) Human but not mouse adipogenesis is critically dependent on LMO3. *Cell Metab* 18:62–74
186. Vassaux G, Gaillard D, Ailhaud G, et al (1992) Prostacyclin is a specific effector of adipose cell differentiation. Its dual role as a cAMP- and Ca(2+)-elevating agent. *J Biol Chem* 267:11092–7
187. Vassaux G, Gaillard D, Darimont C, et al (1992) Differential response of preadipocytes and adipocytes to prostacyclin and prostaglandin E2: physiological implications. *Endocrinology* 131:2393–8
188. Fujimori K (2012) Prostaglandins as PPARgamma Modulators in Adipogenesis. *PPAR Res* 2012:527607
189. Aubert J, Saint-Marc P, Belmonte N, et al (2000) Prostacyclin IP receptor up-regulates the early expression of C/EBPbeta and C/EBPdelta in preadipose cells. *Mol Cell Endocrinol* 160:149–56
190. Ailhaud G (1999) Cross talk between adipocytes and their precursors: relationships with adipose tissue development and blood pressure. *Ann N Y Acad Sci* 892:127–33
191. Forman BM, Tontonoz P, Chen J, et al (1995) 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 83:803–12
192. Kliewer SA, Lenhard JM, Willson TM, et al (1995) A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 83:813–9
193. Fujimori K, Maruyama T, Kamauchi S, et al (2011) Activation of adipogenesis by lipocalin-type prostaglandin D synthase-generated Delta(1)(2)-PGJ(2) acting through PPARgamma-dependent and independent pathways. *Gene* 505:46–52
194. Nosjean O, Boutin JA (2002) Natural ligands of PPARgamma: are prostaglandin J(2) derivatives really playing the part? *Cell Signal* 14:573–83
195. Reginato MJ, Krakow SL, Bailey ST, et al (1998) Prostaglandins promote and block adipogenesis through opposing effects on peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* 273:1855–8
196. Tsuboi H, Sugimoto Y, Kainoh T, et al (2004) Prostanoid EP4 receptor is involved in suppression of 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 322:1066–72
197. Volat FE, Pointud JC, Pastel E, et al (2011) Depressed levels of prostaglandin F2alpha in mice lacking Akr1b7 increase basal adiposity and predispose to diet-induced obesity. *Diabetes* 61:2796–2806
198. Kabututu Z, Manin M, Pointud JC, et al (2009) Prostaglandin F2alpha synthase activities of aldo-keto reductase 1B1, 1B3 and 1B7. *J Biochem* 145:161–8



Adapté de Wagner et al., 2010

Figure 15 : Des bone aux « body » morphogenetic proteins

La famille des BMPs joue un rôle crucial lors du développement embryonnaire mais aussi chez l'adulte. Ces protéines agissent sur de nombreux organes et sont impliquées dans diverses pathologies dont quelques unes sont illustrées ici.

HAP : hypertension artérielle pulmonaire SPJ : syndrome de polypose juvénile. FOP : fibrodysplasie ossifiante progressive

III) Les Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)

1) Les BMPs

Les BMPs sont des cytokines/facteurs de croissance/morphogènes qui appartiennent à la superfamille du TGF- β (transforming growth factor- β). Cette superfamille est complexe de par le nombre de molécules qu'elle englobe, une quarantaine dont les activines, nodals, myostatines, l'hormone antimüllérienne et les BMPs/GDFs (growth differentiation factors) qui constituent le plus large sous-groupe avec une vingtaine de membres (Bragdon et al., 2011). Complexe aussi par la diversité des récepteurs qui interviennent et activent plusieurs voies de signalisation, elles-mêmes régulées par de nombreuses molécules intracellulaires et par de multiples antagonistes extracellulaires. La diversité des protagonistes de cette superfamille permet de réguler plusieurs fonctions cellulaires dont la division, la différenciation, la migration, l'adhésion, la mort cellulaire, aussi bien au cours du développement embryonnaire que chez l'adulte.

Les BMPs ont été initialement décrites pour leurs effets dans le développement de l'os, d'où elles tirent leur nom. Dès 1945, Pierre Lacroix émet l'hypothèse qu'une substance active dérivée de l'os, qu'il appela osteogénine, pouvait initier la formation et la croissance des os. En 1965, cette hypothèse fut confirmée par l'injection de segments d'os déminéralisés et lyophilisés dans le muscle de lapin qui entraîna la formation de « nouveaux os » (Urist, 1965). La notion de substances actives importantes pour la formation de l'os était née, mais les BMPs furent purifiées et clonées dans les années 1980 (Wozney et al., 1988). Depuis, les effets pléiotropes des BMPs ont été décrits. Elles sont conservées par de nombreuses espèces, de l'éponge à l'homme. Au cours de l'embryogenèse, le gradient de concentration de ces morphogènes est essentiel dans la polarisation dorso-ventrale et dans le développement de tous les organes (ou presque) (Hogan, 1996). De fortes concentrations de BMPs sont retrouvées au niveau ventral, des concentrations intermédiaires au niveau latéral, et faibles au niveau dorsal (Kishigami and Mishina, 2005; Ramel and Hill, 2012). Les BMPs sont impliquées dans de nombreux processus, ce qui a conduit certains auteurs à vouloir les renommer « **Body** Morphogenetic Proteins » (figure 15) (Wagner et al., 2010). Récemment les BMP2 et 4 ont été décrites pour leur

implication dans l'adipogenèse blanche (Hata et al., 2003; Bowers and Lane, 2007) et la BMP7 (initialement appelée OP-1, osteogenic protein-1) dans l'adipogenèse brune (Tseng et al., 2008), chez la souris.

a) Synthèse des BMPs

Les gènes codant pour les BMPs sont distincts, ceux des BMP2 et 7 sont situés sur le chromosome 20, celui de BMP4 sur le 14. Alors que les BMPs sont impliquées dans de nombreux processus et étudiées dans divers domaines de recherche, certaines notions de base sur la régulation de leur production et sécrétion restent mal connues.

Les mécanismes de synthèse, maturation et sécrétion des BMPs sont peu décrits dans la littérature. Les BMPs sont synthétisées sous la forme d'un précurseur contenant un peptide signal en position N-terminale et un peptide mature en C-terminale. Ces deux peptides sont reliés par un prodomaine qui est clivé pour donner la forme mature, mais la localisation cellulaire du clivage reste floue. Il est souvent décrit que le précurseur est sécrété puis clivé par des protéases à l'extérieur de la cellule (Walsh et al., 2010; Bragdon et al., 2011). Dans le cas de BMP4, le prodomaine est clivé par une serine endoprotéase au niveau de l'appareil de Golgi (Nelsen and Christian, 2009). Le prodomaine peut rester lié à la forme mature par liaison non-covalente (Sieber et al., 2009). La présence de sept cystéines sur les formes matures des BMPs, avec ou sans le prodomaine, permettent la formation d'homodimères, dont l'activité biologique est plus élevée que les monomères. Les homodimères de BMPs, avec ou sans le prodomaine, sont alors sécrétés. La présence du pro-domaine pourrait entraîner la capture des BMPs par la matrice extracellulaire (Bragdon et al., 2011). Cependant, certaines BMPs, dont BMP2 et BMP4, sont retrouvées dans le sérum humain (Herrera and Inman, 2009).

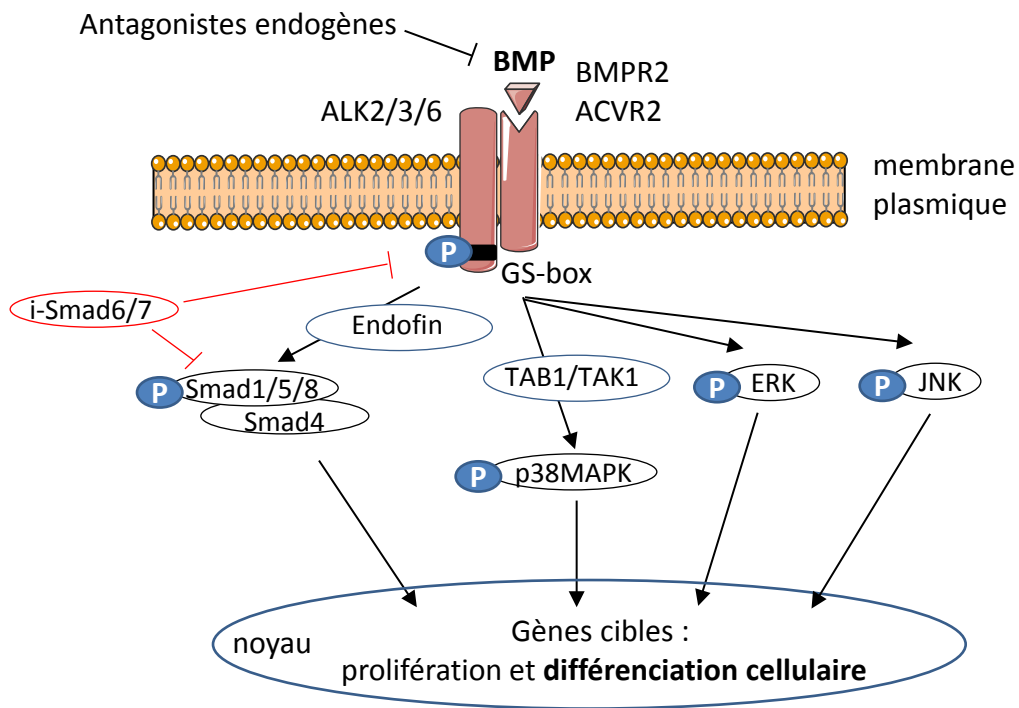


Figure 16 : Voies de signalisation des BMPs

Lors de la liaison d'un dimère de BMP au récepteur de type II (BMPRII ou ACVRII), celui-ci transphosphoryle le récepteur de type I (ALK2, ALK3 ou ALK6) dans sa partie GS-box. Le récepteur de type I active alors la voie canonique, dépendante des Smads, via la protéine Endoglin. Les Smad1/5/8 phosphorylées forment un complexe avec Smad4 et entrent dans le noyau. Ce complexe module l'expression de gènes cibles possédant des éléments de réponse aux Smads (SBE). Les Smads inhibitrices 6 et 7 (i-Smad6/7) inhibent la phosphorylation des Smad1/5/8 par le récepteur de type I ainsi que le recrutement de Smad4. En parallèle, le récepteur de type I active la voie non-canonique, indépendante des Smads, qui fait intervenir plusieurs kinases dont p38MAPK, ERK et JNK. L'action des BMPs peut être modulée par des antagonistes endogènes qui empêchent la liaison des BMPs au récepteur de type II.

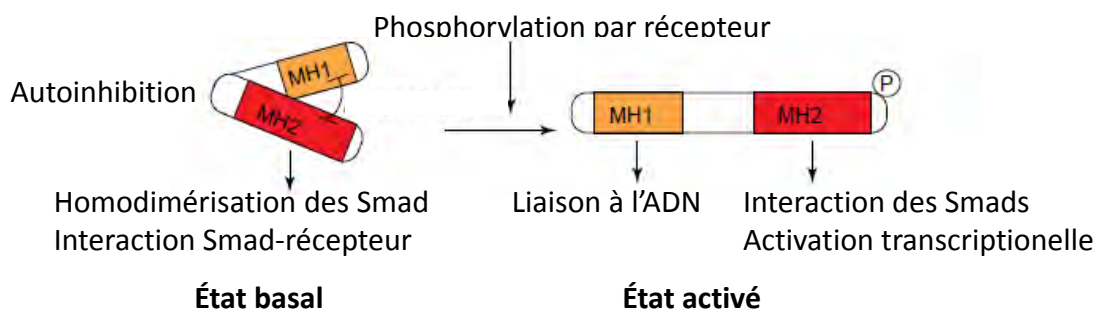


Figure 17 : Structure des Smads et leur activation

Les Smads contiennent deux domaines très conservés entre elles, un domaine MH1 en position N terminale pour la liaison à l'ADN et un domaine MH2 en C terminale pour la formation des complexes Smads. La partie intermédiaire est variable d'une Smad à une autre. Sans stimulation, les Smads forment des homodimères et restent à l'état inactif via l'interaction des deux domaines. Suite à la liaison des BMPs à leurs récepteurs, la partie C terminale des Smads est phosphorylée, ce qui entraîne un changement de leur conformation. Cette modification permet l'interaction entre les différentes Smads puis leur translocation dans le noyau.

Adapté de Hata et al., 1998

b) Récepteurs et voies de signalisation (figure 16)

Beaucoup d'analogies entre les récepteurs et les voies de signalisation activées par le TGF- β et les BMPs existent mais certaines protéines sont spécifiques à chacune des voies. Les récepteurs aux BMPs sont des récepteurs transmembranaires à activité sérine/thréonine kinase. Ils sont de deux types, les récepteurs de type I : ALK2 (activin receptor-like kinase, aussi appelé ACVR1a pour activin type 1 receptor), ALK3 (aussi appelé BMPR1a pour bone morphogenetic protein receptor 1a) et ALK6 (aussi appelé BMPR1b), et les récepteurs de type II que sont BMPR2, ACVR2a et ACVR2b. Les BMP2 et 4 se lient préférentiellement aux récepteurs ALK3, ALK2 et BMPR2 alors que BMP7 se lie préférentiellement aux récepteurs ALK2, ALK3 et ACVR2a. Les récepteurs ALK6 et ACVR2b ne seraient pas impliqués dans la signalisation des BMP2, 4 et 7 (Lavery et al., 2008). De manière générale, la liaison d'un dimère de BMP au récepteur de type II, constitutivement actif, lui permet de phosphoryler un récepteur de type I dans sa partie intracytoplasmique GS-box (Wrana et al., 1994). La voie de signalisation canonique dépendante des protéines Smads et la voie non-canonique indépendante des Smads sont alors activées. Le récepteur de type I phosphoryle le complexe Smad1/5/8 via la protéine adaptatrice Endofin (Shi et al., 2007). Les Smad1/5/8 recrutent Smad4, formant un complexe qui entre dans le noyau et régule l'expression de nombreux gènes. Smad4 est commune à la voie de signalisation des BMPs et du TGF- β mais est recrutée par les Smad2/3 dans le cas du TGF- β . Les Smads comportent deux domaines très conservés entre elles, un domaine MH1 (MAD homology domain 1) en partie N-terminale pour la liaison à l'ADN et un domaine MH2 en partie C-terminale pour la formation des complexes, reliés par une partie variable non-conservée entre les différentes Smads (Nohe et al., 2004) (figure 17 (Hata et al., 1998)). La voie non-canonique fait intervenir plusieurs MAP Kinases (mitogen-activated protein kinases) : p38MAPK, ERK et JNK (Anderson and Darshan, 2008). p38MAPK est activée par l'intermédiaire des protéines TAB1 (Tak binding protein) /TAK1 (Nohe et al., 2004).

c) Modulations extra- et intracellulaires de la signalisation des BMPs

La liaison des BMPs à leurs récepteurs peut être modulée par plusieurs antagonistes et co-récepteurs activateurs ou inhibiteurs. Il existe une vingtaine d'antagonistes des BMPs, ayant chacun des spécificités pour une ou plusieurs BMPs. Par exemple, Chordin inhibe les BMP2/4/7, la follistatine les BMP2/4/6/7/11, Noggin les BMP2/4/5/6/7/13/14 et Tsg (twisted gastrulation) les BMP2/4. Un antagoniste peut inhiber plusieurs BMPs et chaque BMP peut être inhibée par plusieurs antagonistes. Le mode d'action des antagonistes n'est pas clairement établi. Il semblerait qu'ils se lient au dimère de BMP et masquent leurs épitopes de liaison aux récepteurs (Bragdon et al., 2011). Les antagonistes peuvent également interagir entre eux, par exemple l'antagoniste Tsg peut inhiber ou augmenter les capacités de l'antagoniste Chordin à inhiber la BMP4 (Walsh et al., 2010). En plus des différents antagonistes, la présence de co-récepteurs aux BMPs, pouvant être activateur ou inhibiteur, régule la signalisation des BMPs. Le co-récepteur inhibiteur BAMBI (BMP and activin membrane-bound inhibitor) est inhibiteur de l'adipogenèse blanche, sa délétion augmente la différenciation adipocytaire mais de façon contradictoire, elle entraîne la perte de l'effet pro-adipogénique de BMP4 (Luo et al., 2012).

La signalisation intracellulaire des BMPs peut être régulée par des Smads inhibitrices, les Smad6 (Imamura et al., 1997) et Smad7 (Hayashi et al., 1997; Nakao et al., 1997). Ces Smads ne possèdent pas de domaine MH1 et donc ne se lient pas à l'ADN. En l'absence de ligand, les Smad6 et 7 sont localisées dans le noyau (Itoh et al., 1998; Nakayama et al., 1998). En présence de ligands, elles sont exportées dans le cytoplasme et peuvent se lier au récepteur de type I, empêchant l'activation des Smad1/5/8. Smad6 pourrait également inhiber le recrutement de Smad4 au complexe Smad1/5/8 (Itoh et al., 2001) mais aussi inhiber l'activation de p38MAPK (Kimura et al., 2000). Enfin, Smad7 interagit avec les protéines Smurf1 et Smurf2 qui sont des ubiquitines ligases et pourrait ainsi entraîner la dégradation des Smads poly-ubiquitinylées par le protéasome (Zhu et al., 1999). Les Smads inhibitrices sont également modulées. L'enzyme UBE20 (ubiquitine-conjugating enzyme E20) « mono-ubiquitine » Smad6 ce qui empêche son interaction avec le récepteur de type I et augmente ainsi la signalisation de BMP7 (Zhang et al., 2013). Les E3 ubiquitines ligases Arkadia et RNF12 « poly-ubiquitinent » Smad7, ce qui entraîne

sa dégradation par le protéasome et augmente la signalisation des membres de la superfamille du TGF- β (Koinuma et al., 2003; Zhang et al., 2012).

d) Sites de production

Les BMPs sont évidemment produites par les os, mais aussi par le foie, le cœur, le rein, le thymus, le pancréas, le muscle, la rate, le cerveau, la prostate et le poumon, selon le type de BMP (Bragdon et al., 2011). Dans l'os, les BMP2, 4 et 7 sont produites par les ostéoblastes et leurs progéniteurs, les chondrocytes et les ostéoclastes (Suzawa et al., 1999) (Anderson et al., 2000; McCullough et al., 2007). BMP2 et BMP4 sont également produites par plusieurs composants du système vasculaire. En effet, elles sont produites par les mégacaryocytes et transportées par les plaquettes (Sipe et al., 2004) ainsi que par les cellules endothéliales vasculaires et modulées par le shear stress (Sorescu et al., 2004), la pression intraluminale, le peroxyde d'hydrogène H₂O₂, le TNF α (Csiszar et al., 2005), le VEGF et l'hypoxie (Bouletreau et al., 2002). Les cellules musculaires lisses vasculaires et les macrophages produisent également BMP2 (Willette et al., 1999). Un des sites majeur de production de BMP7 est le rein (Wetzel et al., 2006), notamment les podocytes (Kazama et al., 2008).

Concernant le TA, BMP4 est exprimée dans le TA sous-cutané et viscéral humain, et serait négativement corrélée avec l'indice de masse corporelle (Qian et al., 2013). Les BMP4 et BMP7 sont exprimées dans la FSV isolée de TA humain sous-cutané (Elsen et al., 2014). En revanche, aucune donnée n'est disponible sur le(s) type(s) cellulaire(s) producteur(s) de ces BMPs, ni sur la production de BMP2 dans le TA humain. Chez la souris, les BMP2 et BMP4 sont plus exprimées dans les cellules progénitrices isolées du TA sous-cutané que du TA viscéral (Macotela et al., 2012). Au cours de la différenciation adipocytaire, les cellules de la FSV de TA brun immortalisées expriment BMP7 (Schulz and Tseng, 2013), sous le contrôle des protéines EWS (Ewing Sarcoma) et YBX1 (Y-box binding protein 1) (Wang and Hirschberg, 2011; Park et al., 2013).

membre de la famille du TGF- β	effet adipogénique		conséquences métaboliques chez la souris
	chez la souris	chez l'homme	
BMP2	↗ blanc		
BMP3b	↘ blanc		
BMP4	↗ blanc, ↗ brite	↗ blanc, ↗ brite	surexpression: ↗ du "browning" et amélioration de la sensibilité à l'insuline délétion: ↘ de la sensibilité à l'insuline
BMP6	↗ blanc	↗ brite	
BMP7	↗ brun	↗ blanc, ↗ brite	régulation de la prise alimentaire, ↗ de la thermogénèse et de la dépense énergétique
BMP8b			↗ de la thermogénèse ↗ de la dépense énergétique
BMP9	↗ blanc	↗ blanc	
Activine A	↘ blanc	↘ blanc	
Follistatine	↗ blanc, ↗ brun	↗ blanc	
GDF5			surexpression: ↗ du "browning" et de l'adipogenèse brune, amélioration de la glycémie
Myostatine	↘ blanc	↘ blanc	
TGF-β	↘ blanc		
ACVR1a			développement du TA brun
BMPR1a			régulation centrale de la prise alimentaire, développement du TA brun

Figure 18 : Effets de certains membres de la famille du TGF- β sur l'adipogenèse murine et humaine et leurs conséquences métaboliques chez la souris

Tableau récapitulatif des effets de différentes BMPs, des récepteurs ACVR1a et BMPR1a et d'autres membres de la famille du TGF- β sur l'adipogenèse blanche, brite et brune chez la souris et chez l'homme ainsi que leurs effets métaboliques chez la souris.

2) Les BMPs et tissus adipeux

Plusieurs membres des BMPs, mais aussi plus largement de la famille du TGF- β , sont impliqués dans la régulation de l'adipogenèse blanche et brune. Un tableau récapitulatif des effets de diverses protéines sur l'adipogenèse murine et humaine, ainsi que sur le métabolisme chez la souris, se trouve en figure 18.

a) BMP2, BMP4 et BMP7 et adipogenèse

Pendant longtemps, les BMPs ont été connues pour leurs effets pro-ostéogéniques et anti-adipogéniques. En réalité, les BMP2, 4 et 7 sont capables d'induire l'ostéogenèse à forte concentration et l'adipogenèse à faible concentration (Wang et al., 1993; Chen et al., 2001) (figure 19 (Tseng et al., 2008)).

BMP2 et BMP4

Les BMP2 et 4 sont maintenant connues pour leur implication dans l'adipogenèse blanche. Comme abordé dans la partie « Les facteurs de transcription de l'engagement adipocytaire », ces BMPs induisent l'engagement des cellules C3H10T1/2 dans la voie adipocytaire blanche (Ahrens et al., 1993; Hata et al., 2003; Tang et al., 2004; Huang et al., 2009) mais aussi la différenciation des cellules 3T3-L1 (Sottile and Seuwen, 2000) et 3T3-F442A (Ji et al., 2000). Les effets de ces deux BMPs n'ont pas pu être vérifiés *in vivo* par des approches de knock-out (KO). Le KO de BMP2 est létal entre les jours 7 et 9 du développement embryonnaire à cause d'un défaut de développement du cœur (Zhang and Bradley, 1996). Celui de BMP4 entraîne des problèmes de gastrulation et de formation du mésoderme et est létal entre les jours 6 et 9 du développement embryonnaire (Winnier et al., 1995). Les effets de BMP4 sur l'adipogenèse brune restent controversés. Utilisée à 20 ng/ml, BMP4 induit la différenciation brune de cellules C3H10T1/2, alors qu'elle perd ses effets inducteurs de l'expression d'UCP1 à des concentrations de 50 et 100 ng/ml, mais aussi de cellules de la FSV isolées de TA blanc et brun murins (Xue et al., 2014). Dans cette même étude, l'injection sous-cutanée de cellules C3H10T1/2 pré-traitées

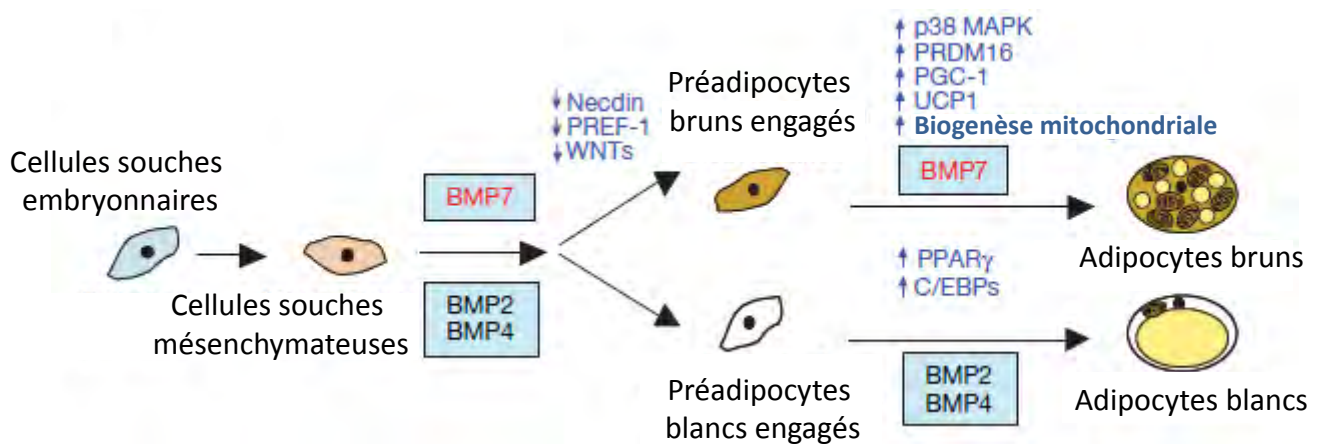


Figure 19 : Effets des BMP2, BMP4 et BMP7 dans l'adipogenèse murine

Chez la souris, les BMP2 et BMP4 sont connues pour leurs effets inducteurs de l'engagement et de la différenciation adipocytaire blanche alors que la BMP7 exerce des effets inducteurs de l'engagement et de la différenciation adipocytaire brune. Lors de l'engagement, la BMP7 induit la diminution de certains facteurs comme la Necdin, PREF-1 et WNTs, et l'augmentation de facteurs de la différenciation brune impliqués notamment dans la mitochondriogenèse.

Adapté de Tseng et al., 2008

par BMP4 à des souris Nude conduit au développement d'un panicule adipeux contenant de nombreux adipocytes multiloculaires et positifs pour UCP1. De même, le traitement de cellules 3T3-L1 par BMP4 (20ng/ml) induit une augmentation de leur différenciation et de l'expression de PRDM16 et PGC1 α , l'expression d'UCP1 n'est pas indiquée (Qian et al., 2013). A l'inverse, BMP4 (entre 112ng/ml et 282ng/ml ?) induit la différenciation de cellules immortalisées de la FSV brune murine mais diminue l'expression d'UCP1, suggérant une différenciation blanche (Tseng et al., 2008). Les effets pro-adipogéniques de BMP4 ont été confirmés chez l'homme. En effet, une augmentation de la différenciation des cellules progénitrices passagées, isolées de TA sous-cutané, a été rapportée suite à un traitement par BMP4 mais les marqueurs brites n'ont pas été évalués dans cette étude (Gustafson and Smith, 2012). Enfin, BMP4 (utilisée à 50ng/ml) induit une différenciation des cellules primaires de la FSV humaine sous-cutanée accompagnée de l'expression d'UCP1, et d'autant plus dans les cellules qui expriment fortement le marqueur brite CD137 (Elsen et al., 2014).

BMP7

BMP7 joue un rôle important dans l'adipogenèse brune chez la souris (Tseng et al., 2008). En effet, cette BMP est capable d'induire l'engagement et la différenciation de cellules de la FSV de TA brun murin immortalisées en adipocytes bruns et de cellules C3H10T1/2 *in vitro*. L'injection de cellules C3H10T1/2 pré-traitées par BMP7 à des souris Nude entraîne le développement d'un panicule adipeux contenant des cellules UCP1 positives, confirmant l'effet engageur de BMP7 dans la voie adipocytaire brune. Le KO de BMP7 est létal peu de temps après la naissance suite à des défauts développementaux des reins (Dudley et al., 1995; Luo et al., 1995). Cependant, les souriceaux KO de un jour présentent une forte diminution de leur TA brun par rapport aux souriceaux sauvages, confirmant le rôle de la BMP7 *in vivo* (Tseng et al., 2008). De manière intéressante, les cellules du mésoderme issu d'embryons de rat de 9 jours, implantées dans la capsule rénale de rat adulte, forment une « tumeur » composée d'adipocytes bruns (Loncar, 1992). Le rein est considéré comme un des organes majeur producteur de BMP7 chez l'adulte (Ozkaynak et al., 1991). De façon indirecte, cette expérience tend à confirmer le rôle de BMP7 dans l'adipogenèse brune *in vivo*. Les effets de BMP7 sur les cellules humaines restent

contradictoires. En effet, BMP7 induit la différenciation brune de la FSV issue de TA sous-cutané, mésentérique et omental (Schulz et al., 2011; Elsen et al., 2014) alors qu'elle n'augmente pas l'expression d'UCP1 par les cellules de la lignée hMADS (Pisani et al., 2011).

b) Autres BMPs et adipogenèse

La transfection de cellules C3H10T1/2 par des adénovirus contenant les BMP2 à 15 a mis en évidence que les BMP2/4/5/7/9/10 augmentent l'accumulation lipidique et l'expression de PPAR γ 2 (Kang et al., 2009). Récemment, BMP6 a été impliquée dans la différenciation en adipocytes bruns de cellules progénitrices musculaires squelettiques murines et humaines. En effet, le traitement par BMP6 induit précocement l'expression de PPAR γ 2 (à 12 heures). Après 13 jours de différenciation, BMP6 induit l'expression de gènes de l'adipocyte brun mais seulement si une stimulation à la forskoline a eu lieu (activateur de l'adénylyl cyclase) (Sharma et al., 2014). Cependant, BMP6 n'induit pas l'expression d'UCP1 dans des cellules immortalisées de la FSV de TA brun murin (Tseng et al., 2008).

BMP9 promeut également l'adipogenèse blanche des cellules 3T3-L1 (Liu et al., 2014) et de cellules humaines primaires commerciales (Lord et al., 2010).

BMP3b est exprimée dans les TA blancs chez la souris et plus particulièrement dans la FSV par rapport aux adipocytes. Sa délétion par siRNA augmente la différenciation adipocytaire blanche de cellules 3T3-L1 et à l'inverse, sa surexpression l'inhibe (Hino et al., 2011).

c) Autres membres de la superfamille du TGF- β et adipogenèse

Hormis les BMPs, de nombreux membres de la famille du TGF β sont produits dans le TA humain et sont impliqués dans le contrôle de l'adipogenèse et dans l'établissement de la fibrose associée à l'obésité.

Activine A

L'activine A est composée d'un homodimère d'inhibine β A. La production d'activine A dans le TA humain est augmentée avec l'obésité (Zaragosi et al., 2010). Certaines cytokines inflammatoires, comme l'IL1 β et le TNF α , mais aussi le TGF- β augmentent la sécrétion d'activine A par des trophoblastes humains (Mohan et al., 2001) et des lignées cellulaires murines embryonnaires (van der Kruijsen et al., 1993) respectivement, *in vitro*. Chez l'homme, les sécrétions des macrophages provenant du TA induisent une augmentation de l'expression de l'activine A par les cellules progénitrices. L'activine A favorise la prolifération des cellules progénitrices de la lignée hMADS et inhibe leur différenciation adipocytaire (Zaragosi et al., 2010). En revanche, l'activine A promeut la différenciation myofibroblastique des cellules progénitrices humaines (Bourlier et al., 2012), ce qui fait de cette molécule un facteur important dans les modifications du TA induites par l'obésité (Dani, 2013). De plus, l'activine A induit une diminution d'expression de C/EBP α et de PPAR γ et inhibe la différenciation adipocytaire des cellules de la lignée 3T3-L1, de manière concentration dépendante (Hirai et al., 2005).

TGF- β

Le TGF- β exerce également un effet anti-adipogénique sur les cellules 3T3-L1 sans modifier leur prolifération (Ignotz and Massague, 1985) ainsi que sur des fibroblastes embryonnaires murins (Tsurutani et al., 2011), et participe à la production de la matrice extracellulaire par différents types cellulaires dont les 3T3 (Ignotz and Massague, 1986). Les souris KO pour Smad3 (qui intervient dans la signalisation du TGF- β) sont résistantes au développement de l'insulino-résistance associée à l'obésité induite par régime gras. Une première étude montre que ces souris présentent une diminution de leur masse grasse et une meilleure tolérance au glucose (Tan et al., 2011). Une deuxième explique ce phénotype par une plus grande proportion de petits adipocytes plus sensibles à l'insuline dans le TA blanc comparé aux souris sauvages, qui pourrait être due à une levée de l'inhibition adipogénique exercée par la voie du TGF- β , et par du « browning » dans le TA blanc (Yadav et al., 2011). Le TGF- β induit également la différenciation myofibroblastique des cellules progénitrices humaines (Bourlier et al., 2012).

Myostatine

La myostatine est connue pour ses effets inhibiteurs de la myogenèse. Cependant, elle inhibe aussi la différenciation adipocytaire blanche des cellules progénitrices humaines et des cellules de la lignée murine 3T3-L1 (Kim et al., 2001; Flanagan et al., 2009), mais aussi la différenciation adipocytaire brune des cellules de la FSV murine (Kim et al., 2012). En revanche son rôle *in vivo* est controversé. Les souris KO pour la myostatine présentent une augmentation de leur masse musculaire et une diminution de leur masse grasse (McPherron and Lee, 2002) mais son administration à des souris sauvages ne modifie pas leur masse grasse (Stolz et al., 2008).

Follistatine

La follistatine est un des antagonistes des BMPs, de la myostatine et particulièrement des activines, qui se lie à ces molécules sécrétées et inhibe leur activité biologique. La follistatine exerce un effet pro-adipogénique, potentiellement via ses effets inhibiteurs de l'activine A. Son expression est majoritairement retrouvée dans les cellules progénitrices humaines par rapport aux autres types cellulaires du TA et diminue avec l'obésité (Flanagan et al., 2009). La follistatine est également induite dans le TA brun chez la souris après une exposition au froid. Elle semble participer à l'adipogenèse brune. En effet, sa délétion dans des fibroblastes embryonnaires murins diminue leur différenciation en adipocytes bruns. De plus, le traitement de cellules de la FSV de TA brun par la follistatine augmente l'expression d'UCP1, de PGC1 α et de PRDM16 (Braga et al., 2014).

d) BMPs et métabolisme énergétique

Plusieurs membres de la superfamille du TGF- β ont récemment été décrits pour leur implication dans la régulation du métabolisme et de la dépense énergétique en jouant soit sur l'adipogenèse brune ou sur le « browning » du TA blanc, soit directement sur la régulation de la thermogenèse (Schulz and Tseng, 2009).

Les récepteurs aux BMPs

Le récepteur BMPR1a (ou ALK3) joue un rôle primordial dans le développement de l'hypothalamus, particulièrement du noyau arqué, et dans la mise en place du circuit de réponse à la leptine après la naissance, chez la souris (Saini et al., 2014). L'ablation de ce récepteur dans les neurones de l'hypothalamus entraîne une hypophagie, une hypoglycémie et une perte de poids conduisant à la mort des souris à l'âge de 4 semaines. Par contre, l'ablation du récepteur BMPR1b (ou ALK6) n'entraîne pas de phénotype particulier (Peng et al., 2012). La délétion du récepteur BMPR1a sous le promoteur Myf5 (pour cibler les progéniteurs du TA brun) ou FABP4 (pour cibler tous les types d'adipocytes) entraîne une forte diminution du TA brun, sans modifier le poids des muscles squelettiques. La perte de TA brun est compensée par une augmentation du « browning » dans le TA inguinal de ces souris qui maintiennent ainsi une température corporelle normale suite à une exposition longue au froid. Les auteurs suggèrent l'existence d'une communication entre le TA brun, le cerveau et le TA blanc permettant de contrôler la régulation de la température corporelle. Dans ce même travail, le récepteur ACVR1a (ou ALK2) a également été impliqué dans la formation du TA brun chez la souris alors que la délétion du récepteur BMPR1b n'entraîne pas de modification de ce tissu (Schulz et al., 2013).

BMP4

Bien que les effets de BMP4 sur l'adipogenèse brune ne soient pas clairement établis, les souris transgéniques exprimant BMP4 sous le promoteur aP2 présentent une augmentation de la présence d'adipocytes bruns dans le TA inguinal associée à une meilleure sensibilité à l'insuline (Qian et al., 2013). BMP4 activerait la voie p38MAPK/ATF2/PGC1 α et induirait ainsi le « browning » du TA inguinal. Cette BMP est davantage exprimée par les adipocytes matures que par la FSV du TA inguinal. Sa délétion dans le TA (souris Cre-aP2) entraîne une augmentation du poids des TA blancs avec une hypertrophie adipocytaire, une accumulation de triglycérides accrue dans le TA brun et une diminution de la sensibilité à l'insuline. Ces résultats suggèrent que BMP4 n'est pas indispensable à la formation des TA blanc et brun. Toutefois, il serait intéressant de savoir si une compensation par une autre BMP se met en place ou si BMP4 provenant d'un autre organe pourrait être amenée par la circulation jusqu'aux TA blancs.

Cependant l'hypertrophie adipocytaire observée pourrait indiquer que l'adipogenèse est perturbée dans ce modèle.

BMP7

En plus de ses effets pro-adipogéniques, BMP7 est capable de moduler le métabolisme énergétique à différents niveaux de l'organisme, chez la souris tout du moins. En effet, elle augmente l'activité mitochondriale des adipocytes bruns *in vitro*. Une étude réalisée sur des adipocytes bruns différenciés (à partir de cellules immortalisées de la FSV de TA brun murin) a montré que BMP7 augmente l'expression de deux transporteurs des acides gras, CD36 (ou FAT, fatty acid translocase) et CPT1 (carnitine palmitoyltransferase 1) qui sont localisés à la membrane plasmique et mitochondriale respectivement. L'augmentation de la captation des acides gras permet d'augmenter leur β -oxydation ainsi que le découplage de la chaîne respiratoire mitochondriale (Townsend et al., 2013). La surexpression de BMP7, par injection d'adénovirus, entraîne une diminution du poids des souris associée à une augmentation de l'expression d'UCP1 dans le TA brun, de la dépense énergétique et de la température corporelle. Les mécanismes responsables des effets de BMP7 (augmentation de l'adipogenèse brune ou effet sur les adipocytes bruns matures) ne sont pas déterminés dans cette étude mais l'induction des adipocytes bruns dans le TA blanc ne semble pas avoir lieu (Tseng et al., 2008). Enfin, l'injection de BMP7 à des souris rendues obèses par régime gras ou à des souris ob/ob entraîne une perte de poids par augmentation de la dépense énergétique mais également par une augmentation de l'expression hypothalamique des peptides anorexigènes POMC et α MSH conduisant à une diminution de la prise alimentaire (Townsend et al., 2012).

GDF5 (BMP14)

La surexpression de GDF5 (growth differentiation factor 5, ou BMP14) dans les TA induit une augmentation de l'expression d'UCP1 dans le TA brun mais aussi dans le TA inguinal. Ce phénotype est associé à une diminution du poids corporel, à une amélioration de la glycémie en régime normal et gras et à une augmentation de la dépense énergétique (sans modifier l'activité

locomotrice) (Hinoi et al., 2014). Les effets anti-obésité de cette BMP sont dus à la promotion de l'adipogenèse brune. En effet, elle induit la différenciation en adipocytes bruns de la FSV isolée de TA blanc inguinal, épидидymaire ou de TA brun via les récepteurs ALK2 et ALK3 et l'activation de Smad5. A l'inverse, des souris exprimant le dominant négatif de GDF5 prennent plus de poids et ont une diminution de l'expression d'UCP1 dans le TA brun associée à une diminution de la dépense énergétique et de la température corporelle. De façon surprenante, l'expression de GDF5 dans le TA brun murin augmente avec l'obésité *in vivo*.

BMP8b

Enfin, BMP8b contrôle la thermogenèse et la dépense énergétique, d'une part en activant le système nerveux sympathique, et d'autre part en agissant directement sur les adipocytes bruns. La production de cette BMP par les adipocytes du TA brun murin est modulée dans plusieurs conditions telles que l'obésité induite par un régime gras, un jeûne ou une exposition au froid, mais aussi après un traitement par l'hormone thyroïdienne T3. BMP8b induit la lipolyse des adipocytes bruns, ce qui permet d'augmenter leur activité de thermogenèse. Des injections intracérébroventriculaires de BMP8b entraînent une augmentation de la température corporelle via une augmentation de l'activité du système nerveux sympathique et diminuent le poids de ces souris. A l'inverse, la délétion de BMP8b entraîne une augmentation de la prise de poids et de la masse grasse (Whittle et al., 2012).

e) BMPs et obésité chez l'homme

Quelques études indiquent une relation entre les BMPs et leurs récepteurs, et l'obésité chez l'homme. En effet, les taux sériques de BMP4 sont positivement corrélés au tour de taille, à l'obésité et au syndrome métabolique (de 3 à 6 pg/ml) (Son et al., 2011). En revanche, il semblerait que les taux sériques de BMP7 ne soient pas modulés en fonction de l'obésité et des paramètres métaboliques, mais positivement corrélés à l'insulinémie à jeun (Zeng et al., 2011). Les variations des taux de BMP2 avec les paramètres métaboliques dans la circulation sanguine,

comme dans le TA humain, n'ont pas été étudiées. Dans une étude sur les pathologies articulaires dégénératives, les taux sériques de ces BMPs ont été déterminés. Chez les individus en bonne santé, les concentrations plasmatiques de BMP2 sont de l'ordre de 40 pg/ml, ceux de BMP4 de 8 pg/ml et BMP7 de 4pg/ml, avec de fortes augmentations chez les individus malades (Albilia et al., 2013). Concernant les récepteurs aux BMPs, l'expression génique de BMPR1a est plus élevée dans le TA viscéral que sous-cutané (Bottcher et al., 2009), inversement celle de BMPR2 est plus élevée dans le TA sous-cutané que viscéral (Schleinitz et al., 2011). Les expressions de ces deux récepteurs augmentent avec l'obésité et le diabète de type 2 dans les deux localisations territoriales.

D'après les données obtenues chez la souris, la famille des BMPs, et particulièrement les BMP2, 4 et 7, semble jouer un rôle important dans la régulation de l'étape d'engagement dans les voies adipocytaires blanche et brune. Cependant, leurs rôles et leurs relevances physiologiques dans l'adipogenèse chez l'homme sont peu connus, à la fois dans l'adipogenèse blanche mais aussi dans la voie brune. De plus, les expressions et productions des BMPs dans le TA humain n'ont pas été déterminées précisément. Si les BMP2, 4 et 7 s'avèrent des inducteurs endogènes de l'adipogenèse humaine, il serait intéressant d'évaluer leurs modulations en fonction de l'état d'obésité et de la localisation du TA afin de définir leurs implications dans le développement des TA humains.

Objectifs

Bien que les cellules progénitrices du TA humain soient identifiées, de nombreuses interrogations demeurent, notamment vis-à-vis des différentes localisations anatomiques. Alors que certaines études suggèrent que les cellules progénitrices des différents dépôts auraient une origine développementale différente, peu d'entre elles ont été menées à partir de ces cellules à proprement parler. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux capacités adipogéniques des cellules progénitrices isolées en fonction de leur dépôt d'origine. Nous avons étudié au sein du TA sous-cutané abdominal, auquel nous avons « facilement » accès en quantité importante, deux localisations très proches que sont les TA superficiel et profond en termes de composition cellulaire et de capacités adipogéniques de leurs cellules progénitrices. Ensuite, nous avons comparé les potentiels des cellules progénitrices des TA sous-cutané abdominal et viscéral. L'ensemble de ces travaux soulève l'implication du microenvironnement dans la régulation de la différenciation adipocytaire et suggère que les « vitesses » de différenciation variables des cellules progénitrices des TA pourraient refléter des états différents au cours du processus d'adipogenèse. Cependant, nous ne disposons pas de marqueurs des différentes étapes de l'adipogenèse. Les données de la littérature indiquent que l'étape la moins connue est celle de l'engagement dans la voie adipocytaire, en particulier pour les cellules progénitrices primaires humaines. L'identification et la caractérisation du préadipocyte humain sont nécessaires pour étudier cet engagement. C'est pourquoi nous avons décidé, dans un second temps, de nous intéresser à l'identification de la cellule la plus engagée parmi les cellules progénitrices du TA humain. L'obtention d'un marqueur du préadipocyte humain est un prérequis indispensable afin d'isoler cette population cellulaire et celle des cellules progénitrices les plus immatures, et donc d'homogénéiser les populations sur lesquelles nous travaillons. Un grand nombre de questions restent en suspens tant que le préadipocyte humain ne sera pas identifié. Comment étudier le processus d'adipogenèse et ses régulations chez l'homme sans avoir un marqueur spécifique du stade préadipocytaire ? Si les pathologies associées à l'obésité proviennent d'un défaut d'accroissement des TA blancs, est-ce que ce défaut découle d'un problème lors de l'engagement ou lors de la différenciation adipocytaire, et comment y

remédier ? Ce défaut est-il le même dans les différents territoires adipeux ? Comment moduler pharmacologiquement l'adipogenèse pour améliorer les paramètres métaboliques sans savoir quelles cellules cibler ? On peut également se demander si le stade préadipocytaire existe réellement *in vivo*, ou si le processus d'adipogenèse est trop « rapide » pour pouvoir observer les préadipocytes à un instant donné. L'identification d'un marqueur du préadipocyte permettrait également de discriminer les facteurs endogènes qui régulent l'engagement de ceux qui régulent la différenciation terminale. D'après les données obtenues chez la souris, l'étape d'engagement est en partie régulée par les BMPs. Dans un dernier temps, nous avons évalué le rôle des BMP2, BMP4 et BMP7 dans l'adipogenèse blanche et brune chez l'homme, ainsi que leur relevance physiologique en termes de productions locales et de leurs modulations en fonction de l'état d'obésité, de résistance à l'insuline et de la localisation anatomique.

Résultats

Comme abordé dans l'introduction, les différentes localisations anatomiques de TA présentent un développement embryonnaire distinct, des activités métaboliques et sécrétoires différentes chez l'adulte et sont de plus en plus considérées comme des mini-organes (Billon and Dani, 2012). Les capacités adipogéniques des cellules de la fraction stroma-vasculaire (FSV) diffèrent aussi selon la localisation du dépôt adipeux. Elles sont supérieures dans le TA sous-cutané (SC) abdominal par rapport au TA mésentérique et au TA omental (Tchkonia et al., 2006; Baglioni et al., 2012). Ces cellules du TA omental possèdent des profils d'expression génique distincts de celles du TA SC (Gesta et al., 2006), ces dernières étant plus proches des cellules du TA mésentérique (Tchkonia et al., 2007). Cependant, d'autres études rapportent des résultats contradictoires montrant que les cellules de la FSV des TA SC et omental possèdent un phénotype très proche (Baglioni et al., 2009), et des capacités équivalentes en terme de différenciation adipocytaire (Shahparaki et al., 2002; Van Harmelen et al., 2004), mais aussi dans d'autres lignages (Baglioni et al., 2009). Enfin, au sein même du TA SC abdominal, on distingue deux territoires, le TA SC superficiel et le TA SC profond selon leur localisation par rapport à l'aponévrose. Les cellules de la FSV du TA SC superficiel présentent une différenciation adipocytaire plus élevée que celles du TA SC profond (Walker et al., 2008). Ces données suggèrent que les cellules progénitrices des différents dépôts pourraient avoir des propriétés et des origines distinctes. Ces résultats, tous obtenus à partir de cellules de FSV, ne permettent pas de conclure quant au potentiel adipogénique des cellules progénitrices elles-mêmes.

Première partie : capacités adipogéniques des cellules progénitrices humaines CD34+/CD31- originaires des TA sous-cutanés abdominaux superficiel et profond.

Nous avons isolé les cellules progénitrices CD34+/CD31- de TA appariés sous-cutanés (SC) superficiel et profond, provenant de femmes en surpoids et en bonne santé. Nous avons montré qu'elles possèdent des capacités de différenciation équivalentes et que, en accord avec la littérature, les cellules de la FSV du TA SC superficiel présentent une capacité adipogénique supérieure à celles du TA SC profond. Nous avons également étudié l'hétérogénéité de la composition cellulaire de la FSV des deux localisations. Les deux localisations possèdent le même nombre de cellules progénitrices, de cellules endothéliales et de macrophages, dont le phénotype est identique. Cependant, nous avons mis en évidence une accumulation de lymphocytes T CD4 plus élevée dans le TA profond que superficiel. Les effets anti-adipogéniques des lymphocytes étant connus (Duffaut et al., 2009), ces résultats suggèrent que ce ne sont pas les cellules progénitrices qui possèdent des capacités adipogéniques différentes mais que les cellules du microenvironnement, et particulièrement les lymphocytes, limitent l'adipogenèse des cellules du TA SC profond. Néanmoins, la culture des cellules de la FSV présente un biais car, pour un nombre équivalent de cellules de la FSV provenant des deux localisations, le nombre de cellules progénitrices devrait être inférieur dans la FSV du TA SC profond étant donné qu'il y a plus de lymphocytes. Il serait donc nécessaire d'évaluer les capacités adipogéniques des cellules progénitrices isolées des deux localisations en présence des sécrétions des cellules immunes superficielles et profondes afin de confirmer ces résultats.

Article : « Cellular heterogeneity in superficial and deep subcutaneous adipose tissues in overweight patients »

Cellular heterogeneity in superficial and deep subcutaneous adipose tissues in overweight patients

Nathalie Boulet · David Estève · Anne Bouloumié · Jean Galitzky

Received: 11 October 2012 / Accepted: 16 November 2012 / Published online: 25 November 2012
© University of Navarra 2012

Abstract Human abdominal adipose tissue (AAT) can be divided into two compartments according to anatomical location to dermis layer, i.e. superficial and deep compartments (sAAT and dAAT). In morbidly obese patients, dAAT mass has been linked to obesity-associated pathologies. In the present study, we characterized in overweight healthy individuals human sAAT and dAAT cellular composition and adipogenic potential. Twelve paired sAAT and dAAT samples were collected. sAAT compared to dAAT adipocytes are larger. In agreement with increased size, real-time PCR analyses performed on isolated adipocytes showed that sAAT adipocytes exhibited higher leptin transcript levels but also higher expression of genes involved in metabolism including hormone-sensitive lipase compared to dAAT adipocytes. Flow cytometry analyses performed on stroma-vascular fraction (SVF) showed no difference in the numbers of progenitor cells, endothelial cells and macrophages between sAAT and dAAT. Macrophage

phenotypes were not distinct between both AAT compartments. However, CD3+ T lymphocyte number was higher in dAAT than in sAAT. Adipogenic potential of dAAT SVF was lower than sAAT SVF whereas the one of isolated progenitor cells was not distinct whatever the AAT compartments. Therefore, in overweight patients, both sAAT and dAAT compartments exhibit differences in terms of adipocytes and T lymphocyte accumulation. dAAT is characterized by higher T lymphocyte accumulation together with smaller less metabolically active adipocytes. The lower adipogenic potential of dAAT SVF is not due to intrinsic progenitor cell properties but more likely to the increased T lymphocyte accumulation.

Keywords Adipocyte · Hypertrophy · T lymphocyte · Macrophage · Progenitor cell

Introduction

Obesity is associated with metabolic disorders. The link between an excessive adipose tissue (AT) development and the increased risk to develop type 2 diabetes and cardiovascular diseases is not fully understood but two main processes are known to play major roles, i.e., inflammation and lipotoxicity. It is now well established that immune cells including T lymphocytes and macrophages accumulate within AT in obesity [6] and contribute to the genesis of insulin resistance [3, 5, 15, 24]. Moreover, during obesity, alteration of the AT lipid

N. Boulet · D. Estève · A. Bouloumié · J. Galitzky
Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UMR1048, Université Toulouse III
Paul-Sabatier, Equipe n 1 (Bat L4),
1 Avenue Jean Poulhès, BP 84225,
31432 Toulouse Cedex 4, France

N. Boulet (✉) · D. Estève · A. Bouloumié · J. Galitzky
Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC),
Equipe n 1 (Bat L4), 1 Avenue Jean Poulhès, BP 84225,
31432 Toulouse Cedex 4, France
e-mail: nathalie.boulet@inserm.fr

buffering capacity might lead to ectopic lipid depots in other metabolically active tissues [11]. AT lipid storage capacity is dependent on its expansion. AT expansion proceeds by a first phase of adipocyte hypertrophy followed by adipocyte hyperplasia [13]. Hyperplasia is the result of the differentiation or adipogenesis of progenitor cells present in AT stroma-vascular fraction (SVF) and characterized as CD34⁺/CD31[−] cells [20, 21, 23]. Simultaneously, increase in the vascular network by angiogenesis may allow AT expansion without hypoxia. AT remodeling appears to be locally controlled by AT immune cells. Indeed, we showed that human AT macrophages, characterized as CD31⁺/CD14⁺ cells, exert a stimulatory effect on angiogenesis but inhibit the adipogenic potential of the human AT progenitor cells [4]. A similar anti-adipogenic effect was observed with human AT T lymphocyte-derived products [9]. In addition, human AT T lymphocyte secretions were shown to inhibit in human mature adipocytes, the stimulatory action of insulin on the expression of both lipogenic enzymes, i.e., fatty acid synthase (FAS) and lipoprotein lipase (LPL) [9].

In humans, adipose tissue is present at distinct anatomical locations including subcutaneous and visceral depots. Depending on the location, its excessive development is differentially associated with metabolic and cardiovascular risk, increased visceral AT (VAT) mass being considered as the most deleterious location [2, 19]. However, among the subcutaneous AT, distinct anatomical locations must be distinguished. Indeed the gluteo-femoral AT is considered as protector, whereas the abdominal AT (AAT) is considered as deleterious in term of early death risk [17]. A debate has arisen regarding the importance of subcutaneous AAT in relation to insulin resistance [1, 22]. Nevertheless, the subcutaneous AAT can be divided into two compartments separated by a membranous layer, superficial and deep AAT (sAAT and dAAT). sAAT is located between the skin and the membranous layer, dAAT is below the membranous layer. dAAT and sAAT have been described to exhibit distinct morphological aspects and metabolic activities [12, 18]. Indeed, dAAT (as VAT) contains more saturated fatty acids than sAAT [16]. dAAT secretions, including leptin and resistin, have been shown to be more similar to the ones of VAT than sAAT [16, 27]. Furthermore, Kelley et al. showed that VAT and dAAT mass are strongly correlated with insulin-resistance whereas sAAT mass was not associated with insulin

effects on glucose metabolism [14]. Moreover, dAAT, and to a higher extent VAT, are correlated with lipid-lipoprotein alterations [7]. Analyses of sAAT and dAAT obtained from morbidly obese patients have shown an increased inflammation in dAAT that was associated with hepatic dysfunction [25]. In order to further define primary processes occurring in both locations during the development of obesity, the current study was performed in superficial and deep AAT from overweight healthy subjects and investigated the cellular composition of both paired AT locations in terms of adipocyte hypertrophy, adipogenesis, angiogenesis, and inflammation.

Materials and methods

Materials

Dispase was obtained from Gibco (Cergy-Pontoise, France). Collagenase type I and albumin were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Depletion kit for human CD45⁺ cells was from Stem Cell Technologies (Grenoble, France) and for CD31⁺ cells was from Dynal-Biotech (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Culture media were from Promocell (Heidelberg, Germany). For flow cytometry analyses, the mouse IgG antibodies (FITC, PerCP, APC, APC-Cy7, PE-Cy7, V450, V500) and the anti-human CD34 (PerCP), CD45 (V500), CD14 (PE-Cy7), CD16 (FITC), CD206 (APC), CD3 (V450), CD8 (PerCP), CD4 (FITC), CD56 (PE-Cy7) and CD19 (APC-Cy7) were from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France). The anti-human CD31 (Pacific Blue) was from BioLegend (Ozyme, Saint-Quentin, France).

Isolation of adipocytes and SVF cells from human sAAT and dAAT

Human AAT were obtained from healthy overweight individuals, undergoing elective surgery for fat removal for aesthetic purposes (mean age 38±7.4 years, mean body mass index (BMI) 27.7±1.84 kg/m²). Fat collection protocols were approved by the Institutional Research Board Ethics Committee. sAAT and dAAT were removed on both sides of the membranous layer (sAAT between the skin and the membranous layer, dAAT below the membranous layer). AT was digested with

dispase (2.4 U/ml in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, volume/volume) for 30 min at 37 °C under constant shaking and after filtration (250 µm), with collagenase (250 U/ml in PBS, 2 % bovine serum albumin (BSA), pH 7.4, volume/volume) for 30 min at 37 °C under constant shaking. After a brief centrifugation (100×g, 1 min, room temperature (RT)), floating adipocytes were recovered and washed in Krebs's Ringer Bicarbonate Hepes Albumin buffer for diameter measurements or lysed in Qiazol (Qiagen, Courtaboeuf, France) for mRNA extraction. The remaining lower phase was centrifugated (300×g, 10 min, RT) and the pellet containing the SVF was suspended in erythrocyte lysis buffer (155 mmol/L NH₄Cl; 5.7 mmol/L K₂HPO₄; 0.1 mmol/L EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid); pH 7.3) for 10 min. Finally, and after successive filtrations through 100-, 70- and 40-µm sieves, SVF cells were suspended in PBS/2 % fetal calf serum (FCS).

Adipocyte diameter measurements

Aliquots (20 µl) of isolated adipocytes were digitized using a photomicroscopy system, and individual diameters (in micrometers) were measured on at least 200 adipocytes for each location using an image analysis system (Nis-Element 2.5 BR, Nikon).

Adipocyte mRNA extraction and real-time PCR

Total RNAs were extracted from adipocytes using the RNeasy kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). The RNA concentration was measured by fluorimetric assay (Ribogreen, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). The RNA was reverse-transcribed using the "Superscript II" kit (Invitrogen). Primers for hormone-sensitive lipase (HSL), adipose triglyceride lipase (ATGL), FAS, LPL, leptin, chemokine (C-C motif) ligand 20 (CCL20) and monocyte chemotactic protein-1 (MCP1) were from Applied Biosystems (Courtaboeuf, France) (Hs00943404_m1, Hs00982040_g1, Hs00188012_m1, Hs00173425_m1, Hs00174877_m1, Hs00171125_m1 and Hs00234140_m1, respectively). The amplification reaction was done in duplicate from 15 ng of the cDNA samples in a final volume of 20 µL in 96-well reaction plates (Applied Biosystems) in a GeneAmp 7500 detection system (Applied Biosystems). All reactions were performed under the same conditions, 50 °C for 2 min; 95 °C for 10 min; 40 cycles of 95 °C for 15 s; and 60 °C

for 1 min. Results were analyzed with the GeneAmp 7500 software and all the values were normalized to the levels of 18S rRNA. Due to smaller size of the biopsies, real-time PCR experiments were performed on seven paired biopsies.

Flow cytometry analyses

At least 100,000 SVF cells (in 100 µl PBS/0.5 % BSA/2 mmol/L EDTA) were incubated with fluorescent-labeled monoclonal antibodies or respective isotype controls (1/20 diluted, 30 min, 4 °C). After washing steps, the labeled cells were analyzed by flow cytometry using a FACScanto II flow cytometer and the Diva Pro software (BD Biosciences).

Adipogenic culture of SVF cells and progenitor cells from human sAAT and dAAT

The crude SVF as well as isolated progenitor cells (obtained after depletion of the CD45⁺ SVF cells using anti-CD45 nanobeads from Stem Cell Technologies (Grenoble, France)) and depletion of CD31⁺ SVF cells using anti-CD31 microbeads from Dynal-Biotech (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) were suspended in ECBM supplemented with 10 % FCS (120,000 cells/cm²). After 24 h incubation, the medium was changed into adipogenic induction media consisting of ECBM supplemented with 50 mg/ml penicillin-streptomycin, 66 nmol/L insulin, 1 nmol/L triiodothyronine, 0.1 µg/ml human transferrin, 100 nmol/L cortisol (basal medium ITTC) or, ITTC and 250 µmol/L isobutylmethylxanthine (IBMX) (ITTCX) or, ITTC and 3 µmol/L rosiglitazone (ITTCR) or both defined as ITTCRX for the first 3 days. Then, cells were shifted in adipogenic maintaining media (ITTC), changed every 2 days and stopped at day 7.

Bodipy (boron-dipyrrromethene) staining

After 7 days of adipogenic culture condition, cells were fixed (paraformaldehyde 4 %, 15 min, RT), and stained with Bodipy 493/503 (10 µg/ml, 15 min, Invitrogen) and Hoechst 33342 (5 µg/ml, 15 min, Invitrogen). Stainings were observed by inversed fluorescent microscope (Nikon Eclipse TE300) and pictures of each adipogenic condition were taken under ×20 objective (numeric camera and acquisition software NIS-Elements 2.5 BR, Nikon).

Triglyceride and DNA content measurements

Intracellular triglyceride content was determined after 7 days of culture in adipogenic media using a kit from Biomérieux (Crapponnes, France). DNA was quantified using Picogreen® (Invitrogen) according to manufacturer instructions.

Statistical analyses

Values are given as mean±SE for (*n*) separate experiments. Comparisons between groups were analyzed either by two-tailed paired Student's *t* test or two-way ANOVA, followed by Bonferroni post-tests. Correlations analyses were performed by Spearman correlation test (Prism 4, GraphPad Software, USA). Differences were considered significant when $P < 0.05$.

Results

Characterization of sAAT and dAAT adipocytes

Mature adipocytes were isolated from paired biopsies of sAAT and dAAT after collagenase digestion (Fig. 1a) and diameters were measured. sAAT adipocytes exhibited higher mean diameter than dAAT adipocytes (96 μm versus 89 μm , $P < 0.0001$, $n = 12$) (Fig. 1b). Analysis of the frequency in adipocyte diameter classes indicated that sAAT contained more hypertrophic adipocytes (diameter more than 100 μm , $P < 0.001$, $n = 12$) while dAAT exhibited smaller adipocytes (diameter less than 80 μm , $P < 0.001$, $n = 12$) (Fig. 1c). No correlation was found between adipocyte size and body mass index whatever the AT location (Fig. 1d). Real-time PCR analyses were performed on mature adipocytes from both AAT compartments. As expected, sAAT larger adipocytes expressed higher leptin levels than dAAT adipocytes ($P < 0.05$, $n = 7$) (Fig. 2). dAAT adipocytes tended to express at lower levels, compared to sAAT mature adipocytes, ATGL, FAS, LPL and 1.4-fold less HSL ($P < 0.05$, $n = 7$). No difference was observed concerning both chemokines, MCP1 and CCL20.

Composition of the sAAT and dAAT stroma-vascular fraction

Flow cytometry analyses were performed on SVF isolated from sAAT and dAAT. No difference in the

number of progenitor and endothelial cells, characterized as CD34+/CD31- and CD34+/CD31+ cells respectively, was observed between sAAT and dAAT (Fig. 3a and b). However, the number of leukocytes (CD45+) in dAAT was higher than in sAAT (1.3-fold, $P < 0.05$, $n = 12$) (Fig. 3c). Total macrophage number (CD45+/CD14+) was similar in both AAT compartments (Fig. 3d). To further characterize distinct macrophage subtypes, CD16 was used as a marker for inflammatory myeloid cells and CD206 as a marker for remodeling macrophages. No CD14+/CD16+ inflammatory monocyte/macrophage was found in both AAT. Remodeling and resident M2 macrophages, characterized as CD14+/CD16- and CD14+/CD16-/CD206+ respectively, were present in the same amount in sAAT and dAAT. On the other hand, the number of T lymphocytes (CD3+) was higher in dAAT than sAAT (2.45-fold, $P < 0.05$, $n = 12$), whereas the number of B lymphocytes (CD19+) and natural killer lymphocytes (CD56+) were equivalent between superficial and deep compartments. Among the T lymphocytes, the number of T helper lymphocytes (CD3+/CD4+) exhibited a tendency to be higher in dAAT (Fig. 3e). We found no difference in T cytotoxic (CD8+) and natural killer T lymphocytes (CD3+/CD56+).

Adipogenic capacity of sAAT and dAAT stroma-vascular fraction and progenitor cells

The whole SVF cells containing progenitor cells, endothelial cells, macrophages and lymphocytes isolated from sAAT and dAAT were cultured in basal adipogenic media (ITTC) for 7 days supplemented or not with cAMP agonist IBMX (ITTCCX), rosiglitazone (ITTCCR) or both (ITTCCRX) for the first 3 days. Adipocyte differentiation was assessed by triglyceride determination and bodipy staining. As shown in Fig. 4, a 3-day time period with supplementation with IBMX alone increased adipocyte differentiation (2.5- and 3.1-fold increase compared to ITTC control condition in dAAT and sAAT, respectively) but the maximal effect was observed in the presence of PPAR γ agonist rosiglitazone with or without IBMX for both SVF locations (14- and 20-fold increase compared to control condition in dAAT and sAAT, respectively, $P < 0.001$). When comparing both locations, the higher adipocyte differentiation was found in the SVF originating from sAAT than in dAAT, especially in presence of

Fig. 1 sAAT and dAAT mature adipocyte size. **a** Representative photomicrographs of adipocytes isolated from sAAT and dAAT ($\times 40$ magnification); **b** sAAT and dAAT mean adipocyte diameter. Data are expressed as mean \pm SE. A two-tailed paired *t* test was used for comparison. $n=12$. *** $P<0.0001$; **c** sAAT and dAAT adipocyte diameter frequency. Data are expressed as mean \pm SE. Two-way ANOVA and Bonferroni post-tests were used. $n=12$. *** $P<0.001$. **d** Correlation between sAAT and dAAT adipocyte size and body mass index. Correlation analysis was performed by using a two-tailed Spearman correlation test

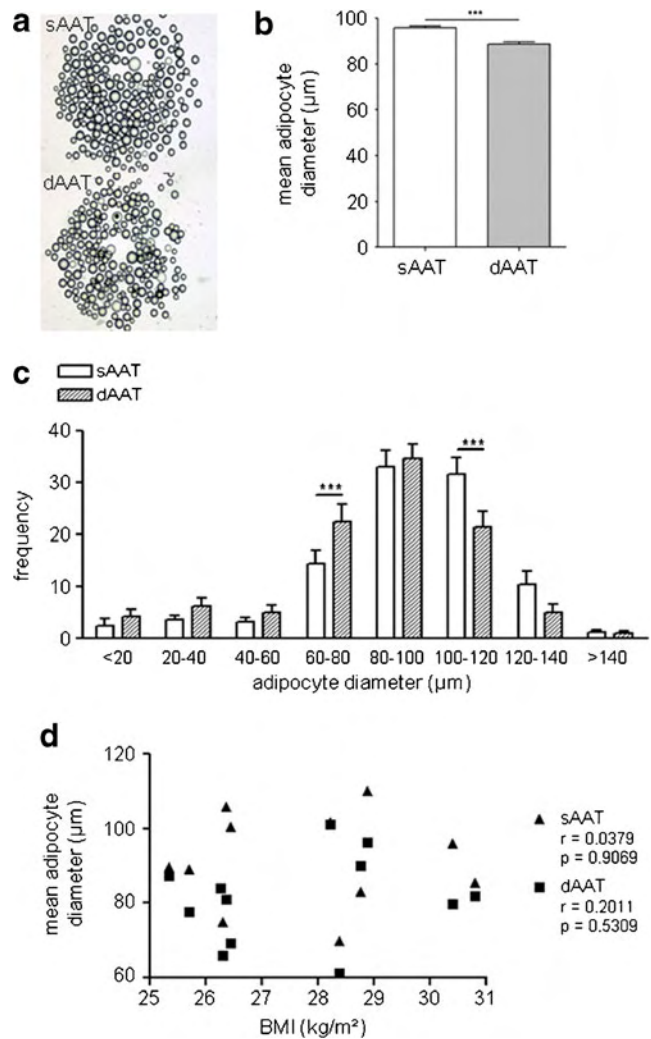
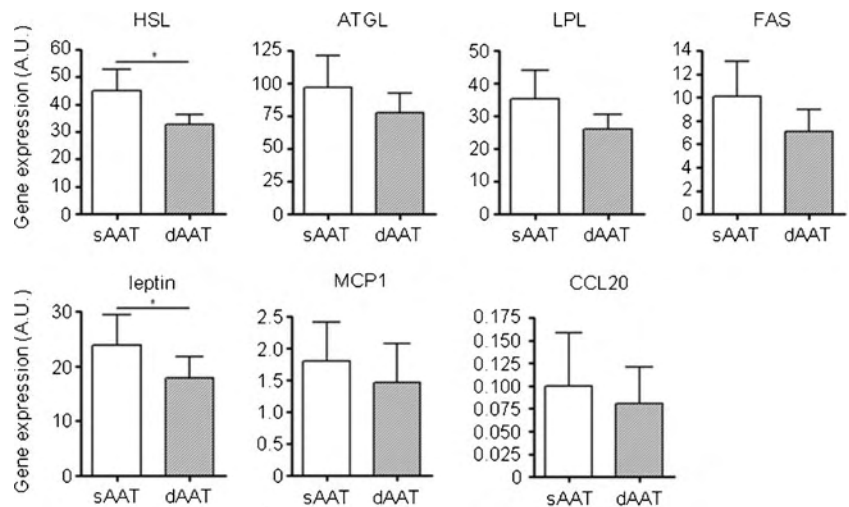


Fig. 2 gene expression profile in sAAT and dAAT mature adipocytes. Total RNAs were extracted from mature adipocytes isolated from sAAT and dAAT and the levels of hormone-sensitive lipase (*HSL*), adipose triglyceride lipase (*ATGL*), lipoprotein lipase (*LPL*), fatty acid synthase (*FAS*), leptin, monocyte chemoattractant protein-1 (*MCP1*) and chemokine (C-C motif) ligand 20 (*CCL20*) mRNA were determined by real-time quantitative PCR analyses. Data are expressed as mean \pm SE. A two-tailed paired *t* test was used for comparison. $n=7$. * $P<0.05$



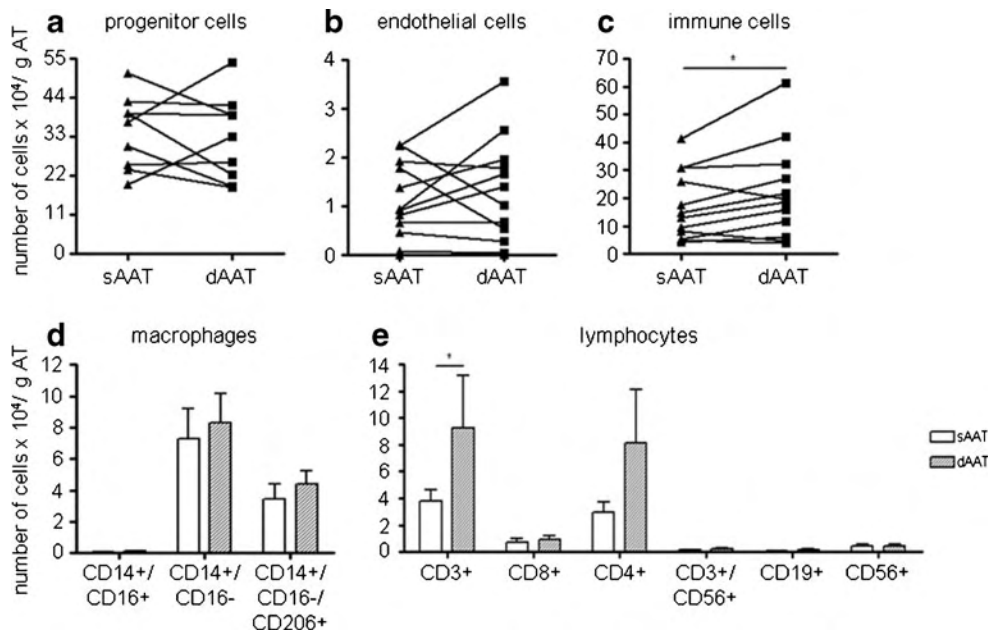


Fig. 3 Cellular composition of sAAT and dAAT SVF. Number of CD34+/CD31- progenitor cells (**a**), CD34+/CD31+ endothelial cells (**b**) and CD45+ immune cells (**c**) per gram of sAAT and dAAT. A two-tailed paired *t* test was used for comparison. *n*=12 **P*<0.05. Number of CD14+/CD16+, CD14+/CD16-, and

CD14+/CD16-/CD206+ macrophages (**d**) and CD3+, CD3+/CD8+, CD3+/CD4+, CD3+/CD56+, CD19+ and CD56+ lymphocytes (**e**) per gram of sAAT and dAAT. Data are expressed as mean \pm SE. Two-way ANOVA and Bonferroni post-tests were used. *n*=12. **P*<0.05

rosiglitazone (1.6-fold more triglycerides/DNA in sAAT compared to dAAT, *P*<0.05) (Fig. 4a and b). The progenitor cells isolated from both sAAT and dAAT SVF exhibited a higher level of differentiation in presence of the PPAR γ agonist than cAMP agonist alone, as observed for SVF (6- and 4.7-fold in sAAT and dAAT respectively) (Fig. 5a and b). When comparing both locations, no difference was found in terms of triglyceride storage in the progenitor cells whatever the conditions. To note, progenitor cells isolated from dAAT showed higher differentiation potential than dAAT whole SVF cells (1.3-fold in rosiglitazone, *P*<0.05) whereas no difference was observed between progenitor cells isolated from sAAT and sAAT whole SVF cells.

Discussion

Human AAT compartments have been suggested to contribute differentially to metabolic disorders such as insulin resistance. In morbid obesity, dAAT has been described to be more inflammatory compared to sAAT and has been associated with liver pathologies [25]. In order to further define primary processes

occurring in both locations during the development of obesity, the current study was performed in superficial and deep AAT from overweight subjects. We found that isolated mature adipocytes from sAAT were more hypertrophic than dAAT adipocytes. In agreement, sAAT adipocytes expressed higher leptin transcript levels than dAAT adipocytes. Such an adipocyte size discrepancy has also been reported in morbidly obese patients [25]. Therefore, it is suggested that adipocyte hypertrophy in sAAT compared to dAAT is a primary event and is not a consequence of obesity. Differences in adipocyte size might be related to distinct metabolic functions as a consequence of increased lipogenesis and/or decreased lipolysis. Interestingly, the expression of both lipogenic enzymes LPL and FAS tended to be higher in sAAT compared to dAAT adipocytes, suggesting that sAAT exhibit higher lipogenic capacity in agreement with larger adipocyte size. To note, the transcripts of both lipolytic enzymes ATGL and HSL were also higher in sAAT compared to dAAT suggesting that despite increased cell size, sAAT adipocytes are more metabolically active than dAAT adipocytes. These results are in agreement with a study of Enevoldsen et al in which the authors

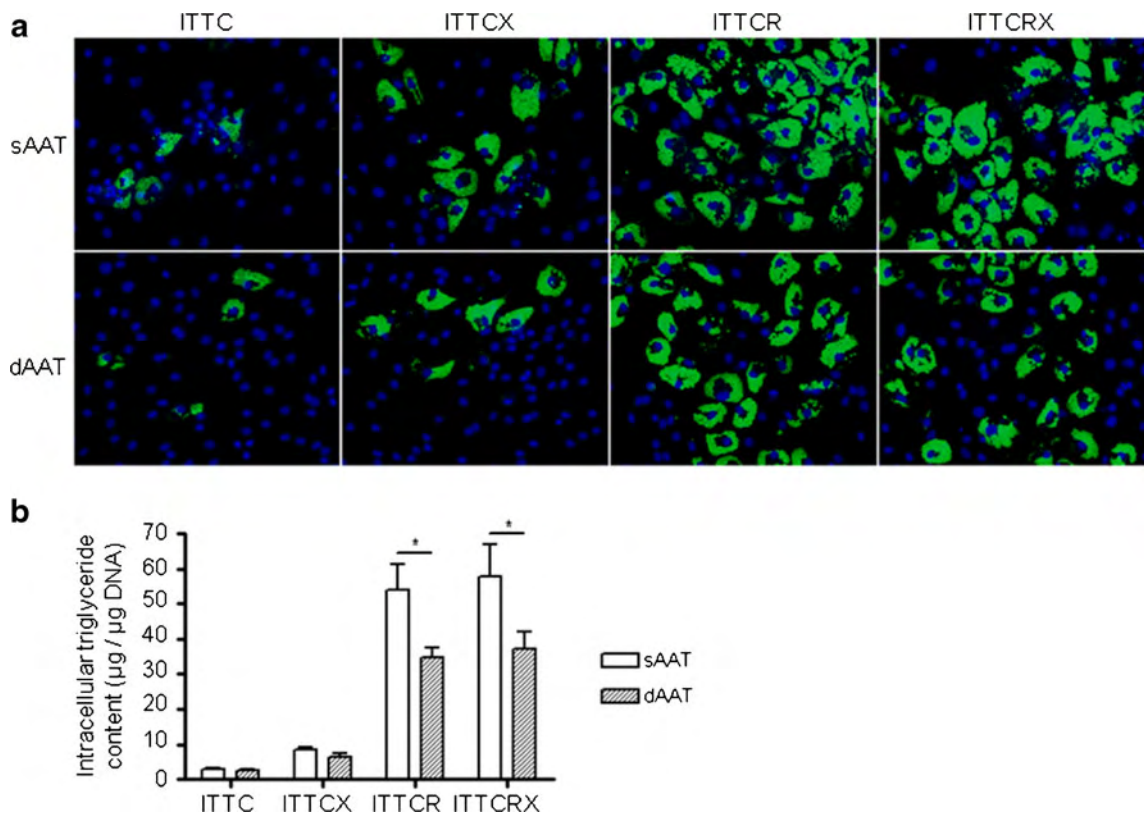


Fig. 4 Adipogenesis of sAAT and dAAT SVF cells. **a** Representative photomicrographs of Bodipy staining of sAAT (*up*) and dAAT (*down*) SVF cells after 7 days of adipogenic induction by ITTC, ITTCX, ITTCR, and ITTCRX and adipogenic maintaining media ($\times 200$ magnification); **b** intracellular triglyceride content

(in micrograms per microgram DNA) after 7 days of adipogenic induction and adipogenic maintaining media. Data are expressed as mean \pm SE. Two-way ANOVA and Bonferroni's post-tests were used. * $P < 0.05$. $n = 4$

showed that sAAT adipocytes exhibited a higher lipolytic rate than dAAT adipocytes [10].

Differences in adipogenic potential have also been involved in the control of adipocyte size, the smaller adipocytes arising from the differentiation of progenitor cells. To determine whether both locations exhibit distinct adipogenic potentials, the number of progenitor cells, characterized as CD34⁺/CD31⁻ cells, was determined by flow cytometry analyses. No difference was found between both AT locations. Moreover, the native progenitor cells immunoselected from sAAT and dAAT and cultured under adipogenic conditions, exhibited no difference in adipogenic potentials whatever the adipogenic induction. Taken together, these results showed that both AAT locations exhibit similar amount of progenitor cells that exhibit similar adipogenic potentials.

Adipocyte hypertrophy has been associated with hypoxia, angiogenesis and inflammation. No difference in endothelial cell number, identified as CD34⁺/

CD31⁺, was found between both locations. Therefore, both sAAT and dAAT exhibited similar capillary network density; a result also reported using immunohistochemistry approaches in morbidly obese patients [25]. Surprisingly, increased leukocyte accumulation characterized by flow cytometry as CD45⁺ cells was observed in dAAT. Further characterization of the leukocyte populations using myeloid and lymphoid cell surface markers showed that only T lymphocyte number was higher in dAAT compared to sAAT. Among lymphocyte populations, T helper lymphocyte was the only leukocyte population that exhibited AT location differences in number since the number of NK cells, NKT cells and B lymphocytes was similar between locations. No difference in macrophage number and subtypes was found. Interestingly, Tordjman et al. showed that macrophage number was higher in dAAT than sAAT from morbidly obese subjects [25]. It is therefore suggested that during obesity, lymphocyte

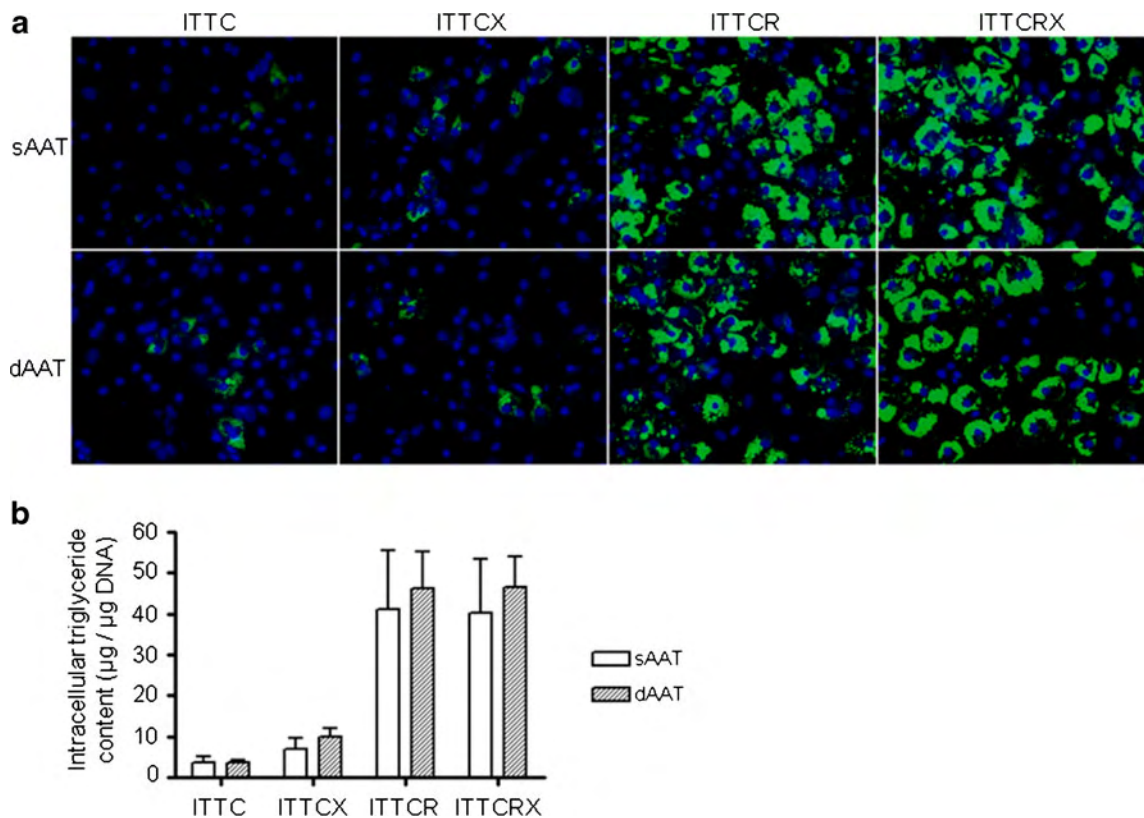


Fig. 5 Adipogenesis of sAAT and dAAT progenitor cells. **a** Representative photomicrographs of Bodipy staining of sAAT (*up*) and dAAT (*down*) progenitor cells after 7 days of adipogenic induction by ITTC, ITTCX, ITTCR, and ITTCRX and adipogenic maintaining media ($\times 200$ magnification); **b**

Intracellular triglyceride content (in micrograms per microgram DNA) after adipogenic induction and 7 days of adipogenic maintaining media. Data are expressed as mean \pm SE. Two-way ANOVA was used for comparison. $n=7$

accumulation in dAAT is a primary event that may occur before macrophage accumulation. In agreement with such a hypothesis, approaches in mice models of obesity had also point out the primary accumulation of T lymphocytes within AT [8]. All together, the present study shows that in overweight patients, dAAT contains smaller adipocytes that exhibit lower expression of metabolic gene profile and higher T lymphocyte number compared to sAAT. It is tempting to speculate that the T lymphocyte accumulation could be responsible of lower dAAT adipocyte size, as anti-lipogenic activity of AT T lymphocytes was described [9]. Moreover, AT T lymphocyte secretions have been shown to exert an anti-adipogenic effect [9]. Such an anti-adipogenic effect might explain the difference in adipogenic potential between whole SVF and isolated progenitor cells between both AT locations. Indeed, whereas progenitor cells alone exhibited similar adipogenic potentials, the adipogenic potential of the whole SVF (containing

progenitor cells but also T lymphocytes) of dAAT was lower than the one of sAAT. Such a lower adipogenic potential of dAAT SVF has already been described although it was attributed to distinct rosiglitazone sensitivity [26].

Taken together, the present study suggests that both AT locations in overweight patients exhibit distinct properties that are not mainly due to intrinsic differences in adipocytes and/or progenitor cells but rather due to the extrinsic microenvironment and more specifically T lymphocyte accumulation. Chronic energy excess leading to obesity might exacerbate the metabolic and inflammatory discrepancies between both sAAT and dAAT and therefore contribute to the emergence of metabolic disorders as insulin resistance.

Acknowledgments This work was supported by INSERM, Paul Sabatier University, région Midi-Pyrénées and Clarins. The authors are grateful for the excellent technical support and

advice of Jean-José Maoret and Frédéric Martins, GeT Plateform, UMR1048/UPS/I2MC, Toulouse, France.

References

- Abate N, Garg A, Peshock RM, Stray-Gundersen J, Grundy SM (1995) Relationships of generalized and regional adiposity to insulin sensitivity in men. *J Clin Invest* 96:88–98
- Bjorntorp P (1990) "Portal" adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes. *Arteriosclerosis* 10:493–496
- Bourlier V, Bouloumie A (2009) Role of macrophage tissue infiltration in obesity and insulin resistance. *Diabetes Metab* 35:251–260
- Bourlier V, Zakaroff-Girard A, Miranville A, De Barros S, Maumus M, Sengenès C, Galitzky J, Lafontan M, Karpe F, Frayn KN, Bouloumie A (2008) Remodeling phenotype of human subcutaneous adipose tissue macrophages. *Circulation* 117:806–815
- Caspar-Bauguil S, Cousin B, Bour S, Casteilla L, Penicaud L, Carpenè C (2009) Adipose tissue lymphocytes: types and roles. *J Physiol Biochem* 65:423–436
- Curat CA, Miranville A, Sengenès C, Diehl M, Tonus C, Busse R, Bouloumie A (2004) From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes* 53:1285–1292
- Deschenes D, Couture P, Dupont P, Tchernof A (2003) Subdivision of the subcutaneous adipose tissue compartment and lipid-lipoprotein levels in women. *Obes Res* 11:469–476
- Duffaut C, Galitzky J, Lafontan M, Bouloumie A (2009) Unexpected trafficking of immune cells within the adipose tissue during the onset of obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 384:482–485
- Duffaut C, Zakaroff-Girard A, Bourlier V, Decaunes P, Maumus M, Chiotasso P, Sengenès C, Lafontan M, Galitzky J, Bouloumie A (2009) Interplay between human adipocytes and T lymphocytes in obesity: CCL20 as an adipokine and T lymphocytes as lipogenic modulators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29:1608–1614
- Enevoldsen LH, Simonsen L, Stallknecht B, Galbo H, Bulow J (2001) In vivo human lipolytic activity in preperitoneal and subdivisions of subcutaneous abdominal adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281:E1110–E1114
- Galgani JE, Moro C, Ravussin E (2008) Metabolic flexibility and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: E1009–E1017
- Gasparoni C, Salgarello M (1995) Rationale of subdermal superficial liposuction related to the anatomy of subcutaneous fat and the superficial fascial system. *Aesthetic Plast Surg* 19:13–20
- Hirsch J, Batchelor B (1976) Adipose tissue cellularity in human obesity. *Clin Endocrinol Metab* 5:299–311
- Kelley DE, Thaete FL, Troost F, Huwe T, Goodpaster BH (2000) Subdivisions of subcutaneous abdominal adipose tissue and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278:E941–E948
- Lolmede K, Duffaut C, Zakaroff-Girard A, Bouloumie A (2011) Immune cells in adipose tissue: key players in metabolic disorders. *Diabetes Metab* 37:283–290
- Lundbom J, Hakkarainen A, Lundbom N, Taskinen MR (2012) Deep subcutaneous adipose tissue is more saturated than superficial subcutaneous adipose tissue. *Int J Obes (Lond)*. doi:10.1038/ijo.2012.72
- Manolopoulos KN, Karpe F, Frayn KN (2010) Gluteofemoral body fat as a determinant of metabolic health. *Int J Obes (Lond)* 34:949–959
- Markman B, Barton FE Jr (1987) Anatomy of the subcutaneous tissue of the trunk and lower extremity. *Plast Reconstr Surg* 80:248–254
- Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, Morton NM, Mullins JJ, Seckl JR, Flier JS (2001) A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science* 294:2166–2170
- Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumie A (2004) Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* 110:349–355
- Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, Andre M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, Duriez M, Tedgui A, Levy B, Penicaud L, Casteilla L (2004) Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 109:656–663
- Ross R, Fortier L, Hudson R (1996) Separate associations between visceral and subcutaneous adipose tissue distribution, insulin and glucose levels in obese women. *Diabetes Care* 19:1404–1411
- Sengenès C, Lolmede K, Zakaroff-Girard A, Busse R, Bouloumie A (2005) Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells. *J Cell Physiol* 205:114–122
- Sun S, Ji Y, Kersten S, Qi L (2012) Mechanisms of inflammatory responses in obese adipose tissue. *Annu Rev Nutr* 32:261–286
- Tordjman J, Divoux A, Prifti E, Poitou C, Pelloux V, Hugol D, Basdevant A, Bouillot JL, Chevallier JM, Bedossa P, Guerre-Millo M, Clement K (2012) Structural and inflammatory heterogeneity in subcutaneous adipose tissue: relation with liver histopathology in morbid obesity. *J Hepatol* 56:1152–1158
- Walker GE, Marzullo P, Verti B, Guzzaloni G, Maestrini S, Zurleni F, Liuzzi A, Di Blasio AM (2008) Subcutaneous abdominal adipose tissue subcompartments: potential role in rosiglitazone effects. *Obesity (Silver Spring)* 16:1983–1991
- Walker GE, Verti B, Marzullo P, Savia G, Mencarelli M, Zurleni F, Liuzzi A, Di Blasio AM (2007) Deep subcutaneous adipose tissue: a distinct abdominal adipose depot. *Obesity (Silver Spring)* 15:1933–1943

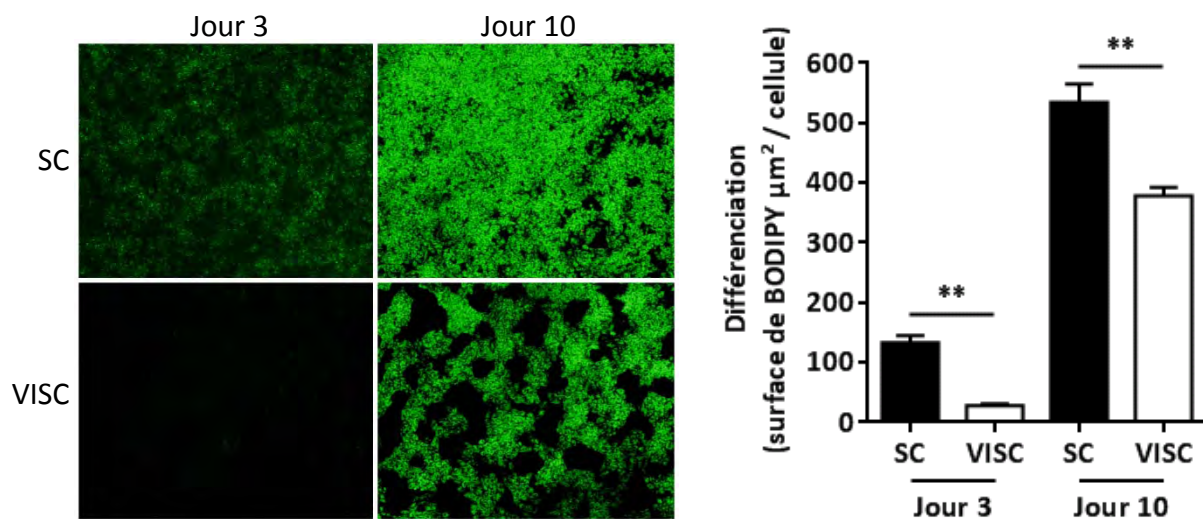


Figure 20 : Capacités adipogéniques des cellules progénitrices isolées des TA sous-cutané abdominal et viscéral

Les cellules progénitrices ont été isolées de TA appariés sous-cutané abdominal et viscéral provenant d'individus obèses morbides, puis mises en culture en milieu adipogénique pendant dix jours, supplémenté en rosiglitazone les trois premiers jours.

Accumulation lipidique marquée au BODIPY dans les cellules progénitrices du TA sous-cutané (SC) et viscéral (VISC) aux temps indiqués, microscopie à fluorescence (objectif 4X) (gauche) et quantification de l'accumulation lipidique (n=6, moyenne \pm SEM, one way ANOVA et post-test de Bonferroni, ** p<0.01) (droite).

Deuxième partie : capacités adipogéniques des cellules progénitrices humaines CD34+/CD31- originaires des TA sous-cutané abdominal et viscéral.

Nous avons également étudié les capacités adipogéniques des cellules progénitrices CD34+/CD31- isolées de biopsies de TA appariés sous-cutané abdominal et viscéral (omental) provenant de patients obèses morbides. Les cellules ont été mises en milieu adipogénique (insuline, triiodothyronine, transferrine, cortisol) pendant dix jours, supplémenté en rosiglitazone les trois premiers jours. Au jour 10, les cellules progénitrices du TA sous-cutané présentent une différenciation adipocytaire plus élevée que celles du TA viscéral (Figure 20). Cette différence est précoce puisque, au jour 3, les cellules progénitrices du TA sous-cutané ont déjà accumulé des gouttelettes lipidiques contrairement à celles du TA viscéral. De plus, alors que l'accumulation lipidique augmente d'un facteur 4 entre le jour 3 et le jour 10 dans les cellules du TA sous-cutané, elle augmente d'un facteur 13 dans celles du TA viscéral. Ces observations nous permettent d'émettre l'hypothèse selon laquelle les cellules du TA viscéral présenteraient un retard dans le processus d'adipogenèse par rapport aux cellules du TA sous-cutané. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons cherché à identifier des marqueurs de surface spécifiques d'un état cellulaire dans le processus d'adipogenèse, le progéniteur engagé ou préadipocyte.

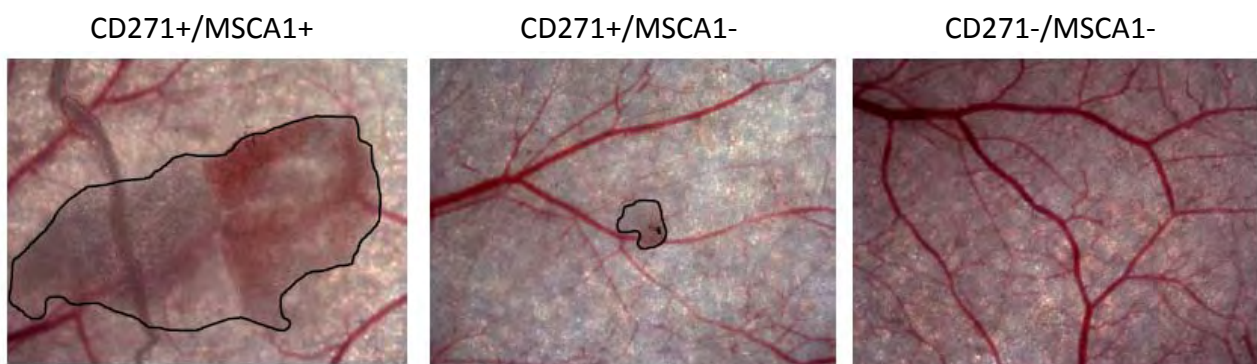


Figure 21 : Capacités adipogéniques des trois sous-types de cellules progénitrices *in vivo*

Les trois sous-types de cellules progénitrices ont été isolés de TA sous-cutané abdominal et implantés, dans leur état natif, dans des gels de fibrine en sous-cutané à des souris NMRI. Six semaines après, les sites d'implantation ont été analysés (n=3).

Photographies des gels contenant les cellules CD271+/MSCA1+, CD271+/MSCA1- et CD271-/MSCA1- aux sites d'implantation (grossissement X2).

Les données précédentes suggèrent que la population de cellules progénitrices CD34+/CD31- est hétérogène et contient des cellules à différents stades du processus d'adipogenèse, du progéniteur le plus immature jusqu'au préadipocyte. Cependant, nous ne disposons pas de marqueur de ces différents états permettant de les distinguer.

Troisième partie : identification d'un marqueur du préadipocyte humain et caractérisation des potentiels adipogéniques du préadipocyte.

Nous avons étudié l'hétérogénéité des cellules progénitrices CD34+/CD31- dans les TA humains sur la base de l'expression de deux protéines membranaires, MSCA1 (ou TNAP, tissue non specific alkaline phosphatase (Sobiesiak et al., 2010)) et CD271 (ou NGFR, nerve growth factor receptor). Ces deux protéines ont permis d'identifier les cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse possédant un potentiel adipogénique (Battula et al., 2009; Buhning et al., 2009). Dans notre étude, la population CD34+/CD31- du TA a pu être divisée en trois sous-types : les CD271+/MSCA1+, les CD271+/MSCA1- et les CD271-/MSCA1-. La population CD271+/MSCA1+ présente un potentiel de différenciation blanche mais également brune et possède des caractéristiques des cellules les plus engagées dans ces voies adipocytaires. L'expression de MSCA1, et l'activité enzymatique qui lui est associée, sont induites au cours de l'adipogenèse et sont nécessaires à ce processus. Ainsi, nous avons identifié MSCA1 comme un marqueur du préadipocyte humain, préadipocyte qui semble commun aux adipocytes blancs et bruns, *in vitro*. Des expériences d'injection en sous-cutané des trois sous-types isolés, dans leur état natif, à des souris Nude ont permis de confirmer que les cellules MSCA1+ sont déjà engagées dans la voie adipocytaire car elles sont les seules capables de conduire au développement d'un dépôt adipeux *in vivo* (figure 21). De plus, nous avons observé que la quantité de cellules CD271+/MSCA1+, déjà engagées dans la voie adipocytaire, dans le TA sous-cutané abdominal est plus importante que dans le TA viscéral chez l'obèse. Ces résultats pourraient expliquer les disparités de différenciation adipocytaire observées entre les deux territoires en figure 20 et conforte l'hypothèse d'un retard des cellules du TA viscéral dans le processus d'adipogenèse.

Une autre observation importante est que la quantité de cellules CD271+/MSCA1+ augmente avec l'indice de masse corporelle dans le TA sous-cutané abdominal. Cette augmentation peut s'expliquer, au moins en partie, par l'influence du microenvironnement. En effet, le microenvironnement du TA est modifié en fonction de l'état d'obésité et régule les capacités adipogéniques des cellules progénitrices en modulant l'expression et l'activité de MSCA1. Ainsi, les cellules immunes du TA, qui s'accumulent avec l'obésité, répriment la différenciation adipocytaire blanche et brite en inhibant l'activité de MSCA1. Enfin, nous avons montré que BMP7 est exprimée dans le TA humain par les cellules progénitrices CD271-/MSCA1-. BMP7 est capable d'induire l'adipogenèse blanche et brite en augmentant l'expression et l'activité de MSCA1. L'ensemble de ces données suggère que les cellules progénitrices CD271+/MSCA1+ au stade préadipocytaire s'accumulent avec l'obésité dans le TA sous-cutané, probablement à cause d'un défaut de différenciation induit par les cellules immunes.

Article : « Human white and brite adipogenesis is supported by MSCA1 and is impaired by immune cells » (accepté pour publication dans le journal *Stem Cells*, sous presse)

Human white and brite adipogenesis is supported by MSCA1 and is impaired by immune cells

Running title: MSCA1 is a player of white/brite adipogenesis

David Estève^{1&2,†}, Nathalie Boulet^{1&2,†}, Fanny Volat^{1&2}, Alexia Zakaroff-Girard^{1,2&7}, Séverine Ledoux³, Muriel Coupaye³, Pauline Decaunes^{1&2}, Chloé Belles^{1&2}, Frederique Gaits-Iacovoni^{2&8}, Jason S. Iacovoni^{1,2&4}, Anne Rémaury⁵, Benjamin Castel³, Pascual Ferrara⁵, Christophe Heymes^{2&6}, Max Lafontan^{1&2}, Anne Bouloumié^{1&2} and Jean Galitzky^{1&2*}.

†: These authors contribute equally to this work

- 1- Inserm, UMR1048, Team 1, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, BP84225, F-31432, Toulouse Cedex 4, France
- 2- Paul Sabatier University, 118, Route de Narbonne, 31062 Toulouse cedex 9, France
- 3- Center Support of Obesity, Hopital Louis Mourier, F-92700, Colombes, France.
- 4- Inserm, UMR 1048, Bioinformatic Platform, I2MC, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, BP84225, F-31432, Toulouse Cedex 4, France.
- 5- Sanofi Aventis R&D, Exploratory Unit, BP13669, F-31036, Toulouse Cedex 1, France.
- 6- Inserm, UMR 1048, Team 13, I2MC, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, BP84225, F-31432, Toulouse, France.
- 7- Inserm, UMR 1048, Cytometry Platform, I2MC, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, BP84225, F-31432, Toulouse Cedex 4, France.
- 8- Inserm, UMR 1048, Team 11, I2MC, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, BP84225, F-31432, Toulouse, France.

* Corresponding author: jean.galitzky@inserm.fr
Phone number: 33 561 32 56 40
Fax number: 33 561 32 56 21
Mailing address: CHU Rangueil, Bâtiment L4
1, avenue Jean Poulhès
BP84225
31432 Toulouse Cedex4 France

Abstract

Obesity-associated inflammation contributes to the development of metabolic diseases. While brite adipocytes have been shown to ameliorate metabolic parameters in rodents, their origin and differentiation remain to be characterized in humans. Native CD45-/CD34+/CD31- cells have been previously described as human adipocyte progenitors. Using two additional cell surface markers, MSCA1 (tissue non-specific alkaline phosphatase), and CD271 (nerve growth factor receptor), we are able to partition the CD45-/CD34+/CD31- cell population into three subsets. We establish serum-free culture conditions without cell expansion to promote either white/brite adipogenesis using rosiglitazone or Bone Morphogenetic Protein 7 (BMP7), or specifically brite adipogenesis using 3-Isobutyl-1-Methylxanthine. We demonstrate that adipogenesis leads to an increase of MSCA1 activity, expression of white/brite adipocyte-related genes and mitochondriogenesis. Using pharmacological inhibition and gene silencing approaches, we show that MSCA1 activity is required for triglyceride accumulation and for the expression of white/brite-related genes in human cells. Moreover, native immunoselected MSCA1+ cells exhibit brite precursor characteristics and the highest adipogenic potential of the three progenitor subsets. Finally, we provided evidence that MSCA1+ white/brite precursors accumulate with obesity in subcutaneous adipose tissue (sAT) and that local BMP7 and inflammation regulate brite adipogenesis by modulating MSCA1 in human sAT. The accumulation of MSCA1+ white/brite precursors in sAT with obesity may reveal a blockade of their differentiation by immune cells, suggesting that local inflammation contributes to metabolic disorders through impairment of white/brite adipogenesis.

Introduction

While obesity in humans is associated with a low-grade inflammatory state and an increased risk to develop cardiovascular and metabolic pathologies, the link between excessive adipose tissue (AT) and metabolic abnormalities remains to be clearly defined. In the last decade, two concepts have emerged. The first concept is related to AT expandability and its buffering activity toward toxic free fatty acids. First of all, AT expandability depends on a physiological turnover of adipocytes, hyperplasia, the formation of new adipocytes from progenitors, and hypertrophy, the capacity of mature adipocytes to increase triglyceride storage. Hyperplasia and adipocyte turnover are sustained by an active, multistep process called adipogenesis. A defect in adipogenesis at the level of adipogenic commitment of mesenchymal stem/progenitor cells to become preadipocytes and/or at the level of preadipocyte differentiation into adipocytes, could limit AT expandability and therefore promote insulin resistance [1]. The second concept involves a new type of adipocyte referred to as the brite adipocyte which ameliorated insulin resistance status in rodent [2]. Brite, also called beige, adipocytes share some common features with brown adipocytes, such as the expression of mitochondrial uncoupling protein 1 (UCP1) and a high mitochondrial content, despite the fact that they reside in white fat depots, predominantly in subcutaneous AT (sAT) [2-4]. While PPAR γ agonists have been known to ameliorate insulin sensitivity and promote adipogenesis, they have only recently been shown to promote the appearance of brite adipocytes in mice cells and white adipose tissue [5-7]. In addition, other stimuli such as β -adrenergic receptor agonists or members of the bone morphogenetic protein (BMP) family have been described to favor the appearance of brite adipocytes in rodent sAT [8-10]. Using *in vivo* cell tracking approaches, murine brite adipocytes have been shown to arise either from the conversion of mature white adipocytes or from the differentiation of AT progenitor cells [11, 12], described as positive for PDGFR α as well as TMEM26, CD137 and CD40 [4, 13]. In humans, the existence of a brite adipocyte phenotype *in situ* remains to be clearly demonstrated, although the expression of brite precursor-related genes were observed in

supraclavicular locations [14, 15]. We showed, *in vitro*, that native CD45-/CD34+/CD31- progenitor cells from adult human AT supported both white and brite adipogenic potentials under PPAR γ agonist treatment [16, 17]. To further discriminate between the specific white and brite precursor cells within the CD45-/CD34+/CD31- progenitor cells, we investigated additional mesenchymal cell surface markers, both *in situ* and *in vitro*. We focused on MSCA1, the tissue non-specific alkaline phosphatase (ALPL) [18] and on CD271, the nerve growth factor receptor (NGFR) which have both been reported to be expressed by bone marrow progenitor cells possessing adipogenic potential [19, 20] but have not been implicated to be relevant in human AT. Taking advantage of our approaches performed on native CD45-/CD34+/CD31- cells from adult human AT, we established serum-free culture conditions without cell expansion to avoid confounding effect of cell proliferation in order to identify human white and brite adipogenic precursors. We developed immunoselection/depletion approaches to partition native progenitor cells into three distinct subsets: CD271+/MSCA1+ (Msc1+), CD271+/MSCA1- (-/Cd271+) and CD271-/MSCA1- (-/-). We provide evidence that MSCA1 is a functional marker of human white and brite adipogenic precursor cells. Therefore, we suggest that in adult human AT, the native progenitor cells are composed of subsets in distinct stages of adipogenic process, the Msc1+ cell subset being the most committed cells toward white and brite adipogenesis. We hypothesize that the accumulation of Msc1+ cells in obese AT might reflect a defect in the last stage of white/brite adipocyte differentiation, due to immune cell accumulation.

Methods

Adipose tissue collection

Cohort 1: Subcutaneous human adipose tissues (AT) were obtained from healthy adult women undergoing aesthetic plastic surgery (n=59, mean BMI 28 ± 5.6 Kg/m² (21.3-39.3), mean age 43.1 ± 11.9 years (26-69)). Cohort 2: Subcutaneous AT were obtained from non-obese women undergoing gynecological surgery (Supplementary Table 1). Subcutaneous and visceral AT matched biopsies were obtained from morbidly obese patients undergoing gastric bypass surgery (Supplementary Table 2) (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01525472). All donors gave their informed consent.

Isolation of adipose tissue stroma-vascular cells

AT was digested with dispase (2.4 U/ml in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, volume/volume) then collagenase (250 U/ml in PBS, 2% bovine serum albumin (BSA), pH 7.4, volume/volume) for 30 minutes at 37°C, the cell suspension was filtered with a 250µm filter. The stroma-vascular cells (SVC) were obtained after centrifugation (room temperature) and treatment with erythrocyte lysis buffer (155 mmol/L NH₄Cl; 5.7 mmol/L K₂HPO₄; 0.1 mmol/L EDTA; pH 7.3) for 10 min. Finally, matrix fragments were removed using successive filtrations through 100, 70, and 40 µm nylon meshes.

SVC were plated at high density (120000 cells per cm²) for 48h in ECGM-MV (Promocell) or at low density (30000 cells per cm²) until high density. Cells were then analyzed for cell surface markers by flow cytometry.

Isolation of cell subsets using immunoselection/depletion with magnetic nanobeads

The CD45-/CD34+/CD31- progenitor cells were obtained from SVC into two steps: immune cells were first removed using a CD45+ cell-depletion step (CD45-depletion kit, Stemcell Technologies) followed by an endothelial cell depletion step using an anti-CD31-depletion kit

(R&D Systems) following each manufacturer's protocol. To further isolate the distinct progenitor cell subsets, the Msca1⁺ cells were selected from the CD45⁻/CD31⁻ cells, the ⁻/CD271⁺ cells were selected from the CD45⁻/CD31⁻/MSCA1⁻ cells and the CD45⁻/CD31⁻/MSCA1⁻/CD271⁻ (-/-) cells using CD34 immuno-magnetic selection kits to improve the purity of this cell subset (MSCA1⁺, CD271⁺ and CD34⁺ immuno-magnetic selection kits were from Miltenyi Biotec). The purity of each fraction was assessed by flow cytometry analyses. Lymphocytes and macrophages were sorted as previously described [21].

Flow cytometry analyses

Cells were incubated with fluorescent-labeled monoclonal antibodies or their respective controls (30 min, 4°C) (anti human CD45 V500-conjugated, CD34 PerCP-conjugated, CD31 V450-conjugated, from BD Biosciences; anti human MSCA1 PE-conjugated and CD271 APC-conjugated, from Miltenyi Biotec). Intra-cellular stainings for IFN γ were performed using PE-CY7 conjugated antibody (BD Biosciences) and BD cytofix/cytoperm reagent (BD Biosciences). Mitochondrial content was assessed using Mitotracker[®] green FM (25 nmol/L, Life Technologies) for 30 min at 37°C before cell surface staining. After washing steps, the cells were analyzed by flow cytometry using a FACS Canto[™] II flow cytometer and Diva Pro software (BD Biosciences).

Adipogenic culture conditions

Cells (stroma-vascular cells, isolated progenitor cells or progenitor cell subsets) were plated at high density (120000 cells per cm²). 36 to 48h after seeding, medium was changed into basal defined adipogenic medium: ECBM (Promocell), 50 mg/ml penicillin-streptomycin, 66 nmol/L Insulin, 1 nmol/L Triiodothyronine, 0.1 μ g/ml Transferrin, 100 nmol/L Cortisol (ITTC) supplemented or not with 3 μ M Rosiglitazone (ITTCR) or 0.25 mM isobuthylmethylxanthine (IBMX) (ITTCX). After 3 days, the media was replaced with basal defined adipogenic medium and refreshed every 2-3 days for the following 7 days. For BMP7 treatment, progenitor cells were

plated in growth medium supplemented or not with 50 ng/mL of human recombinant BMP7 (PeproTech) for 2 days. Progenitor cells were cultured with basal adipogenic media for the next 9 days. For MSCA1 activity inhibition by tetramisole, adipogenesis was induced by adipogenic media containing rosiglitazone supplemented or not with 50 μ M or 500 μ M of tetramisole hydrochloride (Sigma-Aldrich) for 10 days. For inflammatory cytokines treatment, CD45-/CD34+/CD31- cells were cultured in adipogenic media containing rosiglitazone (described above) supplemented or not with 10ng/mL of TNF α , IFN γ or IL17 (PeproTech).

mRNA extraction and Real-Time PCR

Total RNAs were extracted using the RNeasy kit (Qiagen). The RNA concentration was measured with Ribogreen (Invitrogen). RNAs were reverse-transcribed using Superscript[®] II kit (Invitrogen). TaqMan Primers[®] are listed in Supplementary Table 3. The amplification reaction was done on 15 ng of the cDNA samples in a final volume of 20 μ L in 96-well reaction plates in a GeneAmp 7500 detection system and software (Applied Biosystems). Results were normalized to 18S rRNA levels.

Western blot

Cells were lysed with RIPA buffer, protein content was determined by BCA assay (Pierce). Proteins were loaded on 4-12% BisTris electrophoresis gel. Nitrocellulose membrane was incubated with antibodies (UCP1 (Sigma-Aldrich), OXPHOS (ABCAM), SMAD1, P-SMAD1/5/8, ERK1/2, P-ERK1/2, P38MAPK, P-P38MAPK, β -actin (Cell Signaling Technology), BMP7 (ABCAM)) overnight at 4°C in Tris Borate Sodium buffer containing 5% BSA or 5% milk. HRP secondary antibody (Cell Signaling Technology) was incubated 1 h at room temperature (RT). Peroxydase activity was evaluated using West Dura reagent (Pierce) and the Chemidoc detection system (Bio-Rad laboratories).

Immunofluorescence staining

Cells or AT were fixed with paraformaldehyde 4% at RT for 10 min (cultured cells) or up to 1h (AT). Samples were incubated for 15 min with BODIPY 493/503 (10 µg/ml, Invitrogen) or with primary antibody (UCP1, (Sigma-Aldrich), anti mitochondria MAB1273 (Clone 113-1, Millipore), CD271 (Clone ME20.4, Santa Cruz Biotechnology), MSCA1 (Clone W8B2, Miltenyi Biotec) and CD34 (clone EP373Y, Epitomics)) for 1 h at room temperature (overnight at 4°C for AT). Then samples were incubated with appropriate secondary antibodies coupled with Alexa Fluor 488, 546 or 647 (Invitrogen). Nuclei were stained by Hoechst 33342 (Invitrogen). Images were taken with a fluorescent microscope (Nikon Eclipse TE300, software NIS-Elements 2.5 BR, Nikon®) or with a confocal microscope (ZEISS LSM780, software ZEN). Images analyses were performed with ImageJ or ZEN softwares.

Alkaline phosphatase activity

Cells were lysed with Tris (0,1 mM), NaCl (155 mM) 0,1% Triton-X100. Cell lysates were incubated at 37 °C with 50 µM of 4-Methylumbelliferyl-phosphate (MUP, Sigma-Aldrich) in appropriate buffer. Kinetics of MUP degradation was assessed by fluorescence every 3 minutes during 60 minutes and normalized by protein content.

MSCA1 inhibition by esiRNA

Progenitor cells were seeded at a density of 90,000 cells per cm². Cells were transfected with 500 ng/mL of MISSION® esiRNA (Sigma-Aldrich) against MSCA1 or GFP as negative control with 1 µL of lipofectamine® 2000 (Invitrogen) in 1 mL of ECBM (Promocell). After 12 h, medium was removed and cells were cultured under adipogenic conditions (ITTCR).

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using Prism (GraphPad Software). Comparisons between groups were analyzed either by two-tailed paired Student's *t*-test or one-way ANOVA followed by

Bonferroni posttests for (n) independent experiments. Correlations were obtained using Spearman test. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Results

CD45-/CD34+/CD31- progenitor cells are a heterogeneous cell population

Multiparameter flow cytometry analyses were performed on native stroma-vascular cells (SVC) from subcutaneous abdominal AT (sAT) from cohort 1 (see material and methods) using anti-CD45, -CD34, -CD31, -CD271 and -MSCA1 antibodies. Three cell subsets were identified in the gated CD45-/CD34+/CD31- progenitor cell population, referred to as MscA1+ (CD45-/CD34+/CD31-/CD271+/MSCA1+), -/Cd271+ (CD45-/CD34+/CD31-/CD271+/MSCA1-) and -/- (CD45-/CD34+/CD31-/CD271-/MSCA1-) (Figure 1A). The MscA1+ cell subset represented a minor cell subset within progenitor cells (Figure 1A). When comparing sAT to matched visceral AT (vAT) from morbidly obese women from cohort 2 (Suppl. Table 2), MscA1+ cell content was markedly higher in sAT compared to vAT (Figure 1B). We examined the effect of *in vitro* expansion on cell surface markers of SVC (Figure 1C-D). SVC plated at high density exhibited a similar expression of CD34, MSCA1 and CD271 compared to native cells (Figure 1C-D). On the contrary, the SVC plated at low density and expanded *in vitro* until high density presented a dramatic loss of CD34, MSCA1 and CD271 expressions (Figure 1C-D). Gene expression analyses of MSCA1 and CD271 in immunoselected cells from native SVC (progenitor cells, endothelial cells, macrophages and lymphocytes) and mature unilocular adipocytes from sAT showed that progenitor cells exhibited the highest gene expression of MSCA1 and CD271 (Figure 1E). Immunohistochemistry analyses performed on whole AT revealed that mature adipocytes did not express CD271 and MSCA1. Cells positive for CD271 and MSCA1 were also CD34 positive and were located at both perivascular and stromal position (Suppl. Figure 1).

Rosiglitazone increases MSCA1 expression/activity and promotes white and brite adipogenesis

To study the potential link between CD271 and MSCA1 with adipogenesis, native CD45-/CD34+/CD31- cells from sAT were plated at high density and cultured for 10 days in serum-free

adipogenic media (ITTC) supplemented with rosiglitazone for the 3 first days. The adipogenic induction shown by the time-dependent triglyceride accumulation (Figure 2A and Suppl. Figure 2A), was associated with decreased CD271 expression (Figure 2B) and marked increases in MSCA1 transcript levels and MSCA1-related alkaline phosphatase (AP) activity (Figure 2C). The expression of classical adipogenic-related genes (PPAR γ 2, ChREBP, LPL GPDH and PLIN1) was markedly increased with adipogenesis (Figure 2D) as well as the ones of brite adipocyte-related genes (UCP1, PGC1 α , CIDEA, CITED1, ELOVL3) (Figure 2E). In parallel, the cell content in the mitochondrial OXPHOS proteins forming the respiratory chain evaluated by western blot analyses increased and more particularly the complexes I, III and IV (Figure 2F). Further analysis of the mitochondrial architecture and UCP1 expression was performed at day 10 (Figure 2G). Marked changes in mitochondrial network were observed in cells depending on the presence of lipid droplets, with a fusioned mitochondrial network in non-lipid laden cells and a fissioned mitochondrial network in cells containing multiple lipid droplets. In such lipid-laden cells, 34 \pm 9 % cells expressed UCP1 protein that colocalized with mitochondrial labeling. To note, two distinct UCP1 antibodies showed similar staining pattern (Suppl. Figure 2C).

Increasing cAMP levels promote MSCA1 activity and brite adipogenesis

Administration of β -adrenergic receptor agonists has been shown to promote the appearance of the brite phenotype in murine models through increasing cAMP intracellular concentration [13]. To mimic this effect *in vitro* with human cells, we used the phosphodiesterase inhibitor 3-IsoButyl-1-MethylXanthine (IBMX), a classical cAMP-elevating compound. Cells plated at high density were cultured in three distinct serum-free adipogenic conditions: ITTC alone, ITTC supplemented with IBMX (ITTCX) or rosiglitazone (ITTCR) for the 3 first days (Figure 3A). The extent of triglyceride accumulation (Figure 3B and Suppl. Figure 2B) as well as MSCA1 expression and activity (Figure 3C) were found to be intermediate in ITTCX compared to ITTC and ITTCR conditions. The induction of classical adipogenic-related genes (PPAR γ 2, GPDH, LPL and PLIN1) was found similar in both ITTC and ITTCX conditions while markedly enhanced under ITTCR

conditions except for ChREBP expression (Figure 3D). Interestingly, the induction of brite-related genes (UCP1, CIDEA, CITED1, ELOVL3) was intermediate in ITTCX compared to ITTC and ITTCR (Figure 3G). To note PGC1 α transcript levels did not follow such a pattern. The specific brite adipogenic induction mediated by IBMX was confirmed by UCP1 immunohistochemistry and western blot analyses (Figure 3E-F).

BMP7 is a promoter of white and brite adipogenesis and is locally expressed in human AT

Among the factors that have been shown to regulate brown and brite adipocyte differentiation, BMP7 was described as a candidate. We evaluated the impact of BMP7 on white and brite adipogenesis and its physiological relevance in AT. BMP7 transcript levels were detected predominantly in progenitor cells when compared to other AT-cell populations, i.e. mature adipocytes, endothelial cells and immune cells (Figure 4A). Western blotting of progenitor cells identified a BMP7 pro-peptide at 49 kDa (Suppl. Figure 3A). Analysis of the BMP responsiveness of human native progenitor cells showed that ALK2, ALK3, ACVR2 and BMPR2 (but not ALK6) transcripts were identified in CD45⁻/CD34⁺/CD31⁻ cells (Figure 4B). BMP7 stimulation of progenitor cells induced the phosphorylation of the SMAD1/5/8 complex and P38MAPK but not ERK1/2 (Figure 4C). When cells were cultured in basal adipogenic media after a 2-day treatment with BMP7 (Figure 4D), a modest but significant increase of MSCA1-related AP activity and expression (Figure 4E), a slight but significant increase in triglyceride accumulation (Figure 4F) and UCP1 protein were observed (Figure 4G and I). The expression of classical adipogenic-related genes (PPAR γ 2, ChREBP, GPDH, LPL and PLIN1) and brite-related genes (UCP1, CITED1 and ELOVL3) was increased in BMP7 pretreated progenitor cells compared to untreated cells (Figure 4H). Co-treatment with a pharmacological inhibitor of P38MAPK activity (SB203580) led to a decrease in lipid accumulation (Suppl. Figure 3E-F) and MSCA1-related AP activity (Figure 4E), while co-treatment with the ERK1/2 pharmacological inhibitor PD98059 had no effect (Suppl. Figure 3E-F).

Inhibition of MSCA1 gene expression and activity impairs adipogenesis

The induction of MSCA1-related AP activity was found to be closely related to the induction of UCP1 protein (Figure 5A) regardless of the brite inducer used (rosiglitazone, IBMX or BMP7), suggesting that MSCA1-related AP activity was involved in brite adipogenesis. CD45-/CD34+/CD31- were transfected with esiRNA against MSCA1 or control and cultured under adipogenic condition containing rosiglitazone for the 3 first days. Reduced MSCA1 gene expression with esiRNA (Figure 5C) was associated with reduced expression of classical adipogenic-related and brite adipocyte-related genes at day 10 (Figure 5D). While our data showed that esiRNA treatment resulted in a modest reduction in the levels of MSCA1 transcript, this was in agreement with the range of esiRNA efficiency that can be obtained with native progenitor cells [22]. We confirmed a functional role for MSCA1 in brite adipogenesis by treating human native progenitor cells with the pharmacological alkaline phosphatase inhibitor, tetramisole [23]. Since the IC₅₀ of tetramisole on AP activity was described to be around 60μM [24], progenitor cells were treated with 50μM or 500μM of tetramisole during rosiglitazone-induced adipogenesis. Lack of toxicity was demonstrated by no changes in cell number (Suppl. Figure 4A) and nuclei morphology (data not shown). Inhibition of AP activity by tetramisole led to a concentration-dependent decrease in lipid accumulation (Suppl. Figure 4B) and expression of classical adipogenic-related and brite adipocyte-related genes at day 10 (PPAR γ 2, ChREBP, GPDH, LPL, PLIN1, UCP1, CIDEA, CITED1) (Figure 5E). To note, expression of PGC1 α was not modulated.

The brite adipogenic potential derives from the human MscA1+ native progenitor cell subset

In order to further delineate the adipogenic potential of the three cell subsets, a magnetic immunoselection/depletion approach was developed. The purity of each cell subset was controlled by gene expression and flow cytometry analyses (Suppl. Figure 5A-B). Native immunoselected MscA1+ cells exhibited higher gene expression levels for brite-related genes (CD137, TMEM26,

CITED1, CIDEA, ELOVL3), for classical adipogenic-related genes (PPAR γ 2, ChREBP and PLIN1) (Figure 6A) and a higher mitochondrial content (Figure 6B) compared to the other two progenitor subsets. β 2-adrenergic receptor gene expression was higher in Msc1+ cells compared to other progenitor subsets and to note β 3-adrenergic receptor gene expression was not detected in any progenitor subsets (Figure 6A). Moreover, PDGFR α , PDGFR β , DECORIN and ZFP423 that were recently described to be expressed by murine preadipocyte were detected but not discriminant between the 3 human progenitor subsets (Figure 6A and Suppl. Figure 5C). BMP receptors gene expression were found to be equivalent in the 3 progenitor subsets (Suppl. Figure 3D). To note, among the progenitor cell subsets, the -/- cell subset exhibited the highest levels of BMP7 transcript and pro-peptide (Suppl. Figure 3B-C). Hierarchical analysis of differential gene expression between cell subsets clearly highlighted Msc1+ cells as the progenitor cell subset expressing at the highest level the brite adipocyte-related genes (CIDEA, PGC1 α , β 2-AR, CD137, ELOVL3, CITED1, PRDM16) and at the lowest level the anti-adipogenic-related genes (KLF2, DNER or SFRP4) (Suppl. Figure 5C). Finally, the adipogenic potentials of the three immunoselected progenitor subsets were analyzed *in vitro*. Native cells were plated at high density and cultured under ITTCX (brite induction) (Figure 6C-H) and ITTCR (white and brite induction) (Figure 6I-N). In ITTCX condition, the brite adipogenic potential was clearly supported by Msc1+ cells as shown by triglyceride accumulation (Figure 6F and 6E), brite-related gene expression (Figure 6H) and increased MSCA1 AP activity (Figure 6D). In ITTCR condition, the three subsets exhibited white and brite adipogenic potential as shown by triglyceride accumulation (Figure 6L and 6K), brite-related gene expression (Figure 6N) and UCP1 expression (Figure 6M, Suppl. Figure 7B-C) but more marked for Msc1+ cells. Interestingly, ITTCR condition led to an increase in MSCA1 AP activity and expression in both -/Cd271+ and -/- cells (Figure 6J and Suppl. Figure 6C). In depth analyses showed that the -/- and -/Cd271+ exhibited hallmarks of less differentiated cells including delay in triglyceride accumulation and in adipogenic gene expression at day 3 (Suppl. Figure 6A-B) and smaller lipid droplets (Suppl. Figure 7E). To note, we confirm these results using a fluorescence activated cell sorter approach to isolate progenitor cell subsets

and validated that magnetic immunoselection/depletion did not affect adipogenic differentiation (Suppl. Figure 8).

Impact of obesity and local inflammation on white and brite adipogenesis

Using the cohort 1, the relation between the adiposity index and the relative abundance of Msc1+ brite precursor cells in sAT was investigated. Msc1+ cell content was positively correlated with BMI (Figure 7A). MSCA1 gene expression in progenitor cells also increased with obesity (Figure 7B). Using cohort 2 composed of non-obese ($\text{BMI} \leq 28 \text{ kg/m}^2$, Suppl. Table 2) and morbidly obese women ($\text{BMI} > 35 \text{ kg/m}^2$, Suppl. Table 3), we confirmed that Msc1+ cell content in sAT was higher in obese compared to non-obese women (Figure 7C). In the same cohort, the content of immune cells (including macrophages and T-lymphocytes) was as expected markedly higher in obese compared to non obese women (Figure 7C).

To assess the potential role of local AT immune cells on adipogenesis, SVC and matched immunoselected progenitor cells plated at high density were cultured in ITTCR. At day 10, both SVC and matched progenitor cells accumulated triglycerides but UCP1 induction was higher in progenitor cells compared to SVC (Figure 7D). Immune cells were still present and active in SVC as assessed by flow cytometry and immunohistochemistry analyses (Suppl. Figure 9). To mimic the effect of the presence of immune cells in SVC, progenitor cells were treated with the inflammatory cytokines $\text{TNF}\alpha$, IL17 or $\text{IFN}\gamma$. $\text{TNF}\alpha$ and $\text{IFN}\gamma$ dramatically reduced lipid accumulation and UCP1 expression while IL17 had a modest effect (Figure 7E). Both $\text{TNF}\alpha$ and $\text{IFN}\gamma$ markedly inhibited MSCA1 AP activity (Figure 7G), while only $\text{TNF}\alpha$ reduced MSCA1 gene expression (Figure 7F). In agreement with the involvement of MSCA1 AP activity in brite adipogenesis, both cytokines inhibited the induction of most of the brite adipocyte-related genes (Figure 7H).

Discussion

Despite the fact that brite adipocytes are considered to be a therapeutic target of interest in the fight against obesity-related pathologies [25, 26], their existence in human sAT has not been clearly demonstrated. The present study, performed on isolated human native progenitor cells, identifies committed progenitor cells with white and brite adipogenic potential as CD45-/CD34+/CD31-/CD271+/MSCA1+. *In situ*, Msca1+ cells exhibit characteristics of the brite precursor phenotype such as high mitochondrial content, elevated expression levels of brite-related genes and predominantly located within sAT. Using pharmacological treatments (IBMX or rosiglitazone) or an endogenous adipogenic inducer (BMP7), we demonstrate that MSCA1 AP activity is associated with and necessary for adipogenesis, since its inhibition leads to a decrease in the adipogenic potential of human progenitor cells. We demonstrate that Msca1+ cell content increases with obesity, using two different human cohorts. It is therefore tempting to speculate that the accumulation of Msca1+ white/brite precursors in sAT with obesity may reveal a blockade of their final differentiation by immune cells, suggesting that local inflammation could contribute to metabolic disorders through an impairment of white/brite adipogenesis.

To identify human native brite precursors within CD45-/CD34+/CD31- progenitor cells, we investigated the expression of additional cell surface markers, namely MSCA1 and CD271. In human bone marrow, both are expressed on progenitor cells that possess adipogenic potential [19, 20]. Moreover, alkaline phosphatase deficient mice do not possess fat depots [27] and CD271 deficient mice exhibit reduced body weight [28], observations in agreement with a potential involvement of both MSCA1 and CD271 in AT development. Unfortunately, alkaline phosphatase deficient mice die a few days after birth [29] and CD271 deficient mice present an elevated neonatal mortality [30]. However, no data are currently available concerning their relevance in human AT and/or adipogenesis. In the present study, we identified within human AT stroma-vascular cells (SVC) three progenitor subsets which we referred to as Msca1+, -/Cd271+ and -/-. *In vitro* expansion of SVC resulted in the loss of expression of identified markers. Consequently, all the

experiments performed in this study were done on native cells plated at high density. Msc1+ cells were the least abundant subset and exhibited a significantly higher content in human sAT compared to matched vAT. This location-dependent pattern raised our interest due to the fact that the brite adipogenic potential has been predominantly found in mice sAT [3, 12, 31, 32]. To assess *in vitro* adipogenesis, we set up serum-free culture conditions that employ a short-term inducer treatment followed by culture in minimal adipogenic media. This protocol was designed to exclude chronic inducer effects on gene expression and focus on the differentiation state. Induction of white/brite adipogenesis by rosiglitazone treatment has been already reported in mice as well as in human multipotent adipose derived stem cells (hMADS) [5, 7, 17, 33] and *in vivo* long term PPAR γ agonist administration was reported to promote the appearance of brite adipocytes in mice [6]. In the present study we demonstrated that short-term rosiglitazone induced brite adipogenesis in human native progenitor cells. Moreover mitochondrial changes were observed, with an increase in expression of proteins responsible for oxidative phosphorylation, and a morphological transformation from an elongated to a fragmented network, a hallmark of mitochondrial activation in rodent brown AT [34]. Induction of white/brite adipogenesis by rosiglitazone was associated with a rapid up-regulation of the MSCA1 transcript and AP activity prior to lipid accumulation. Furthermore, approaches using either esiRNA against MSCA1 or pharmacological inhibition of AP activity led to a decrease in white and brite adipogenesis, demonstrating a functional involvement of MSCA1 in the adipogenic processes.

Catecholamines such as norepinephrine have been described to promote brite adipogenesis in rodent models through β 3-adrenergic stimulation and a subsequent increase in intracellular cAMP [8, 32]. Differences in expression of β -adrenergic receptors in AT were documented between rodent and humans [2] and no β 3-adrenergic receptor activity was found in human AT [35, 36]. Since the native human progenitor subsets do not express β 3-adrenergic receptor, we tested the impact of IBMX, an inhibitor of phosphodiesterases that increases intracellular cAMP. We found that IBMX was not only able to specifically induce brite-related genes, but also increase both the

expression and activity of MSCA1, albeit this induction was less pronounced than with rosiglitazone treatment. Finally, we investigated the involvement of a physiologically relevant brite inducer, BMP7, reported to play a major role in brown AT development in mice and to promote differentiation of murine brown preadipocytes [10, 37]. Short-term BMP7 treatment led to white and brite differentiation and increased MSCA1 expression and activity in human progenitor cells. The extent of brite differentiation obtained after our 2 day treatment with BMP7, while modest compared to our other cell culture conditions, is in agreement with a recent publication reporting a brite adipogenic induction after a 14 day treatment [9]. Western blotting with our human progenitor subsets revealed the presence of the BMP7 pro-peptide, with a specific enrichment in the -/- subset. To further dissect the responsible signaling pathways, we showed that SMAD1/5/8 and P38MAPK were activated upon BMP7 treatment. While BMP7 stimulated MSCA1 AP activity, co-culture with P38MAPK inhibitor blocked this stimulation, suggesting that BMP7-mediated up-regulation of MSCA1 AP activity requires P38MAPK. In rodents, activation of P38MAPK has been shown to be involved in brite adipogenesis induced by both the β 3-adrenergic receptor as well as PPAR γ -agonists [38, 39]. Moreover P38MAPK has been described to enhance stability of PGC1 α and to promote uncoupled respiration in muscle cell mitochondria [40]. It is thus tempting to speculate that P38MAPK could be at the crossroads of the pathways activated by the various brite inducers. Future experiments will focus on defining the role of P38MAPK in brite adipogenesis.

In mice, the origin of brite adipocytes remains under debate. Some studies showed white to brite adipocyte conversion [11] while others highlighted the differentiation of specific precursors into brite adipocytes in mice [12, 13] and in a human cell line [41]. Although we cannot exclude the existence of mechanisms that allow human white to brite adipocyte inter-conversion, we identify MSCA1 as a functional marker of human native white and brite precursor cells. Indeed, *in situ*, MscA1⁺ cells exhibited a brite precursor cell phenotype with a high mitochondrial content and elevated expression levels of brite precursor-related genes including CD137, TMEM26, CIDEA,

CITED1 and ELOVL3 [4]. To note, CD40, a rodent brite-related marker [4], did not allow a clear segregation between the distinct human progenitor cell subsets, suggesting additional species-specific differences. PDGFR α [13], PDGFR β [42, 43] and DECORIN [44], described as markers of white adipose progenitors either in rodent or human AT, were detected at similar levels in the 3 progenitor subsets. The study of Berry et al. highlighted that the rodent PDGFR α cells were composed by two cell subsets at distinct stages of white adipogenic process, preadipocytes being defined by lack of CD24 expression [45]. In human WAT, no cell surface markers are available to discriminate the progenitor cells according to adipogenic state [46], stressing further the need for relevant positive markers for preadipocytes. Our present study identifies MSCA1 as a positive functional marker of the human preadipocyte. Lack of MSCA1 in -/Cd271+ and -/- subsets emphasizes their immature state towards the adipogenic program. Indeed, under rosiglitazone culture conditions both -/Cd271+ and -/- subsets exhibited a delayed adipogenic potential, associated with the induction of MSCA1 gene expression and AP activity, indicating that the Mscal+ subset may arise from both subsets.

Finally, by the use of two independent cohorts, we show that the Mscal+ cell content is higher in sAT from obese compared to non-obese women. We speculated that such an increase may originate from accumulation of Mscal+ precursor cells that do not undergo further differentiation. To analyze the local signals that could block differentiation, we investigated the impact of inflammation in condition respecting the stoichiometry within AT of progenitor versus immune cells. Therefore we compared the brite adipogenic potential of SVC (progenitor cells and immune cells) versus matched isolated progenitor cells treated with the most effective adipogenic inducer: rosiglitazone. Progenitor cells, in the presence of immune cells, specifically lost their brite adipogenic potential. We focused thereafter on three candidate inflammatory cytokines already described to inhibit adipogenesis but that have not been studied in the context of brite adipogenesis, TNF α [47, 48], IFN γ [49] and IL17 [50]. IFN γ and IL17 did not affect MSCA1 gene expression but all three cytokines inhibited MSCA1 activity and subsequent brite adipogenesis,

albeit to varying degrees. In murine models, anti-inflammatory macrophages have been shown to promote appearance of brite adipocytes whereas pro-inflammatory macrophages do not [51-54]. Recent studies performed in mice showed that impaired brite adipogenic potential is associated with metabolic dysfunctions such as type 2 diabetes [31, 32, 55]. The involvement of an immune component in the impairment of brite adipogenesis represents an intriguing mechanism. We hypothesize that immune cells infiltration within AT occurring with obesity, if persistent, will create a deleterious inflammatory microenvironment that could disrupt the dynamic turn-over of adipocytes in human sAT leading to the accumulation of Msc1+ precursor cells blocked in a non-differentiated state.

Conclusion

We have demonstrated the existence of a common white and brite-competent progenitor cell subset within human AT characterized as CD45-/CD34+/CD31-/CD271+/MSCA1+. In addition, we have shown that MSCA1 plays a functional role in white and brite adipogenesis which is impaired by immune cells. Therefore, we reveal multiple avenues for therapeutic intervention against metabolic diseases. First, anti-inflammatory strategies could ameliorate the metabolism of obese individuals by improving AT expandability and/or brite adipogenesis. Second, the alkaline phosphatase activity of MSCA1, or downstream effectors, could be targeted to improve adipogenesis directly.

Acknowledgments

This work was financially supported by the INSERM, Sanofi-Aventis R&D, Clarins Dermocosmetique, and the region Midi-Pyrénées.

We acknowledge Professor Grolleau-Raoux from aesthetic surgery department, Rangueil Hospital, and Doctor N'Guyen from gyneco-obstetrics department, Louis Mourier Hospital, for the collection of AT samples and their associated patient information. We appreciate greatly the advice from the Cellular Imaging facility TRI platform and GeT-TQ transcriptomic platform.

No conflicts of interest relevant to this article were reported.

Author contributions:

David Esteve: Conception and design, Collection and/or assembly of data, Data analysis and interpretation, Manuscript writing, Final approval of manuscript

Nathalie Boulet: Conception and design, Collection and/or assembly of data, Data analysis and interpretation, Manuscript writing, Final approval of manuscript

Fanny Volat: Collection and/or assembly of data

Alexia Zakaroff-Girard: Collection and/or assembly of data, Data analysis and interpretation

Séverine Ledoux: Provision of study material or patients

Muriel Coupaye: Provision of study material or patients

Pauline Decaunes: Collection and/or assembly of data

Chloé Belles: Data analysis and interpretation

Frederique Gaits-Iacovoni: Data analysis and interpretation

Jason S. Iacovoni: Data analysis and interpretation, Manuscript writing

Anne Rémaury: Conception and design

Benjamin Castel: Provision of study material or patients

Pascual Ferrara: Conception and design, Data analysis and interpretation,

Christophe Heymes: Collection and/or assembly of data

Max Lafontan: Conception and design

Anne Bouloumié: Conception and design, Data analysis and interpretation, Manuscript writing,
Final approval of manuscript

Jean Galitzky: Conception and design, Collection and/or assembly of data, Data analysis and
interpretation, Manuscript writing, Final approval of manuscript

References

1. Gesta, Tseng and Kahn, *Developmental origin of fat: tracking obesity to its source*. Cell, 2007. **131**(2): p. 242-56.
2. Harms and Seale, *Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential*. Nat Med, 2013. **19**(10): p. 1252-63.
3. Schulz, Huang, Tran, *et al.*, *Identification of inducible brown adipocyte progenitors residing in skeletal muscle and white fat*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(1): p. 143-8.
4. Wu, Bostrom, Sparks, *et al.*, *Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human*. Cell, 2012. **150**(2): p. 366-76.
5. Petrovic, Walden, Shabalina, *et al.*, *Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes*. J Biol Chem, 2010. **285**(10): p. 7153-64.
6. Wilson-Fritch, Nicolero, Chouinard, *et al.*, *Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone*. J Clin Invest, 2004. **114**(9): p. 1281-9.
7. Cuaranta-Monroy, Simandi, Kolostyak, *et al.*, *Highly efficient differentiation of embryonic stem cells into adipocytes by ascorbic acid*. Stem Cell Res, 2014. **13**(1): p. 88-97.
8. Wu, Cohen and Spiegelman, *Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown?* Genes Dev, 2013. **27**(3): p. 234-50.
9. Elsen, Raschke, Tennagels, *et al.*, *BMP4 and BMP7 induce the white-to-brown transition of primary human adipose stem cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2014. **306**(5): p. C431-40.
10. Schulz, Huang, Huang, *et al.*, *Brown-fat paucity due to impaired BMP signalling induces compensatory browning of white fat*. Nature, 2013. **495**(7441): p. 379-83.
11. Rosenwald, Perdikari, Rulicke, *et al.*, *Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes*. Nat Cell Biol, 2013. **15**(6): p. 659-67.
12. Wang, Tao, Gupta, *et al.*, *Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration*. Nat Med, 2013. **19**(10): p. 1338-44.
13. Lee, Petkova, Mottillo, *et al.*, *In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by beta3-adrenoceptor activation and high-fat feeding*. Cell Metab, 2012. **15**(4): p. 480-91.
14. Jespersen, Larsen, Peijs, *et al.*, *A classical brown adipose tissue mRNA signature partly overlaps with brite in the supraclavicular region of adult humans*. Cell Metab, 2013. **17**(5): p. 798-805.
15. Sharp, Shinoda, Ohno, *et al.*, *Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e49452.
16. Sengenès, Lolmede, Zakaroff-Girard, *et al.*, *Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells*. J Cell Physiol, 2005. **205**(1): p. 114-22.
17. Elabd, Chiellini, Carmona, *et al.*, *Human multipotent adipose-derived stem cells differentiate into functional brown adipocytes*. Stem Cells, 2009. **27**(11): p. 2753-60.
18. Sobiesiak, Sivasubramanian, Hermann, *et al.*, *The mesenchymal stem cell antigen MSCA-1 is identical to tissue non-specific alkaline phosphatase*. Stem Cells Dev, 2010. **19**(5): p. 669-77.
19. Battula, Treml, Bareiss, *et al.*, *Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1*. Haematologica, 2009. **94**(2): p. 173-84.
20. Buhning, Treml, Cerabona, *et al.*, *Phenotypic characterization of distinct human bone marrow-derived MSC subsets*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1176**: p. 124-34.

21. Decaunes, Esteve, Zakaroff-Girard, *et al.*, *Adipose-derived stromal cells: cytokine expression and immune cell contaminants*. Methods Mol Biol, 2011. **702**: p. 151-61.
22. Lee, Pickering and Puri, *Prolonged efficiency of siRNA-mediated gene silencing in primary cultures of human preadipocytes and adipocytes*. Obesity (Silver Spring), 2013.
23. Ali, Penny, Paiker, *et al.*, *The effect of alkaline phosphatase inhibitors on intracellular lipid accumulation in preadipocytes isolated from human mammary tissue*. Ann Clin Biochem, 2006. **43**(Pt 3): p. 207-13.
24. Debray, Chang, Marques, *et al.*, *Inhibitors of tissue-nonspecific alkaline phosphatase: design, synthesis, kinetics, biomineralization and cellular tests*. Bioorg Med Chem, 2013. **21**(24): p. 7981-7.
25. Peschechera and Eckel, *"Browning" of adipose tissue--regulation and therapeutic perspectives*. Arch Physiol Biochem, 2013. **119**(4): p. 151-60.
26. Bartelt and Heeren, *Adipose tissue browning and metabolic health*. Nat Rev Endocrinol, 2013. **10**(1): p. 24-36.
27. Narisawa, Frohlander and Millan, *Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia*. Dev Dyn, 1997. **208**(3): p. 432-46.
28. Fan, Jaenisch and Kucera, *A role for p75 receptor in neurotrophin-3 functioning during the development of limb proprioception*. Neuroscience, 1999. **90**(1): p. 259-68.
29. Matsumoto, Miyake, Yamamoto, *et al.*, *Rescue of severe infantile hypophosphatasia mice by AAV-mediated sustained expression of soluble alkaline phosphatase*. Hum Gene Ther, 2011. **22**(11): p. 1355-64.
30. von Schack, Casademunt, Schweigreiter, *et al.*, *Complete ablation of the neurotrophin receptor p75NTR causes defects both in the nervous and the vascular system*. Nat Neurosci, 2001. **4**(10): p. 977-8.
31. Hinoi, Nakamura, Takada, *et al.*, *Growth differentiation factor-5 promotes brown adipogenesis in systemic energy expenditure*. Diabetes, 2014. **63**(1): p. 162-75.
32. Cohen, Levy, Zhang, *et al.*, *Ablation of PRDM16 and beige adipose causes metabolic dysfunction and a subcutaneous to visceral fat switch*. Cell, 2014. **156**(1-2): p. 304-16.
33. Pisani, Djedaini, Beranger, *et al.*, *Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells into "Brite" (Brown-in-White) Adipocytes*. Front Endocrinol (Lausanne), 2011. **2**: p. 87.
34. Wikstrom, Mahdavian, Liesa, *et al.*, *Hormone-induced mitochondrial fission is utilized by brown adipocytes as an amplification pathway for energy expenditure*. Embo J, 2014. **33**(5): p. 418-36.
35. Tavernier, Barbe, Galitzky, *et al.*, *Expression of beta3-adrenoceptors with low lipolytic action in human subcutaneous white adipocytes*. J Lipid Res, 1996. **37**(1): p. 87-97.
36. Carpenne, Galitzky, Fontana, *et al.*, *Selective activation of beta3-adrenoceptors by octopamine: comparative studies in mammalian fat cells*. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 1999. **359**(4): p. 310-21.
37. Tseng, Kokkotou, Schulz, *et al.*, *New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure*. Nature, 2008. **454**(7207): p. 1000-4.
38. Cao, Medvedev, Daniel, *et al.*, *beta-Adrenergic activation of p38 MAP kinase in adipocytes: cAMP induction of the uncoupling protein 1 (UCP1) gene requires p38 MAP kinase*. J Biol Chem, 2001. **276**(29): p. 27077-82.
39. Teruel, Hernandez, Benito, *et al.*, *Rosiglitazone and retinoic acid induce uncoupling protein-1 (UCP-1) in a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent manner in fetal primary brown adipocytes*. J Biol Chem, 2003. **278**(1): p. 263-9.
40. Puigserver, Rhee, Lin, *et al.*, *Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1*. Mol Cell, 2001. **8**(5): p. 971-82.
41. Karbiener, Pisani, Frontini, *et al.*, *MicroRNA-26 family is required for human adipogenesis and drives characteristics of brown adipocytes*. Stem Cells, 2014. **32**(6): p. 1578-90.

42. Traktuev, Merfeld-Clauss, Li, *et al.*, *A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks.* Circ Res, 2008. **102**(1): p. 77-85.
43. Tang, Zeve, Suh, *et al.*, *White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature.* Science, 2008. **322**(5901): p. 583-6.
44. Daquinag, Zhang, Amaya-Manzanares, *et al.*, *An isoform of decorin is a resistin receptor on the surface of adipose progenitor cells.* Cell Stem Cell, 2011. **9**(1): p. 74-86.
45. Berry and Rodeheffer, *Characterization of the adipocyte cellular lineage in vivo.* Nat Cell Biol, 2013. **15**(3): p. 302-8.
46. Berry, Jeffery and Rodeheffer, *Weighing in on adipocyte precursors.* Cell Metab, 2014. **19**(1): p. 8-20.
47. Tchkonina, Giorgadze, Pirtskhalava, *et al.*, *Fat depot-specific characteristics are retained in strains derived from single human preadipocytes.* Diabetes, 2006. **55**(9): p. 2571-8.
48. Isakson, Hammarstedt, Gustafson, *et al.*, *Impaired preadipocyte differentiation in human abdominal obesity: role of Wnt, tumor necrosis factor-alpha, and inflammation.* Diabetes, 2009. **58**(7): p. 1550-7.
49. Vidal, Bermeo, Li, *et al.*, *Interferon gamma inhibits adipogenesis in vitro and prevents marrow fat infiltration in oophorectomized mice.* Stem Cells, 2012. **30**(5): p. 1042-8.
50. Shin, Shin and Noh, *Interleukin-17A inhibits adipocyte differentiation in human mesenchymal stem cells and regulates pro-inflammatory responses in adipocytes.* Biochem Pharmacol, 2009. **77**(12): p. 1835-44.
51. Kusminski, Park and Scherer, *MitoNEET-mediated effects on browning of white adipose tissue.* Nat Commun, 2014. **5**: p. 3962.
52. Qiu, Nguyen, Odegaard, *et al.*, *Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat.* Cell, 2014. **157**(6): p. 1292-308.
53. Rao, Long, White, *et al.*, *Meteorin-like Is a Hormone that Regulates Immune-Adipose Interactions to Increase Beige Fat Thermogenesis.* Cell, 2014. **157**(6): p. 1279-91.
54. Wernstedt Asterholm, Tao, Morley, *et al.*, *Adipocyte inflammation is essential for healthy adipose tissue expansion and remodeling.* Cell Metab, 2014. **20**(1): p. 103-18.
55. Seale, Conroe, Estall, *et al.*, *Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice.* J Clin Invest, 2011. **121**(1): p. 96-105.

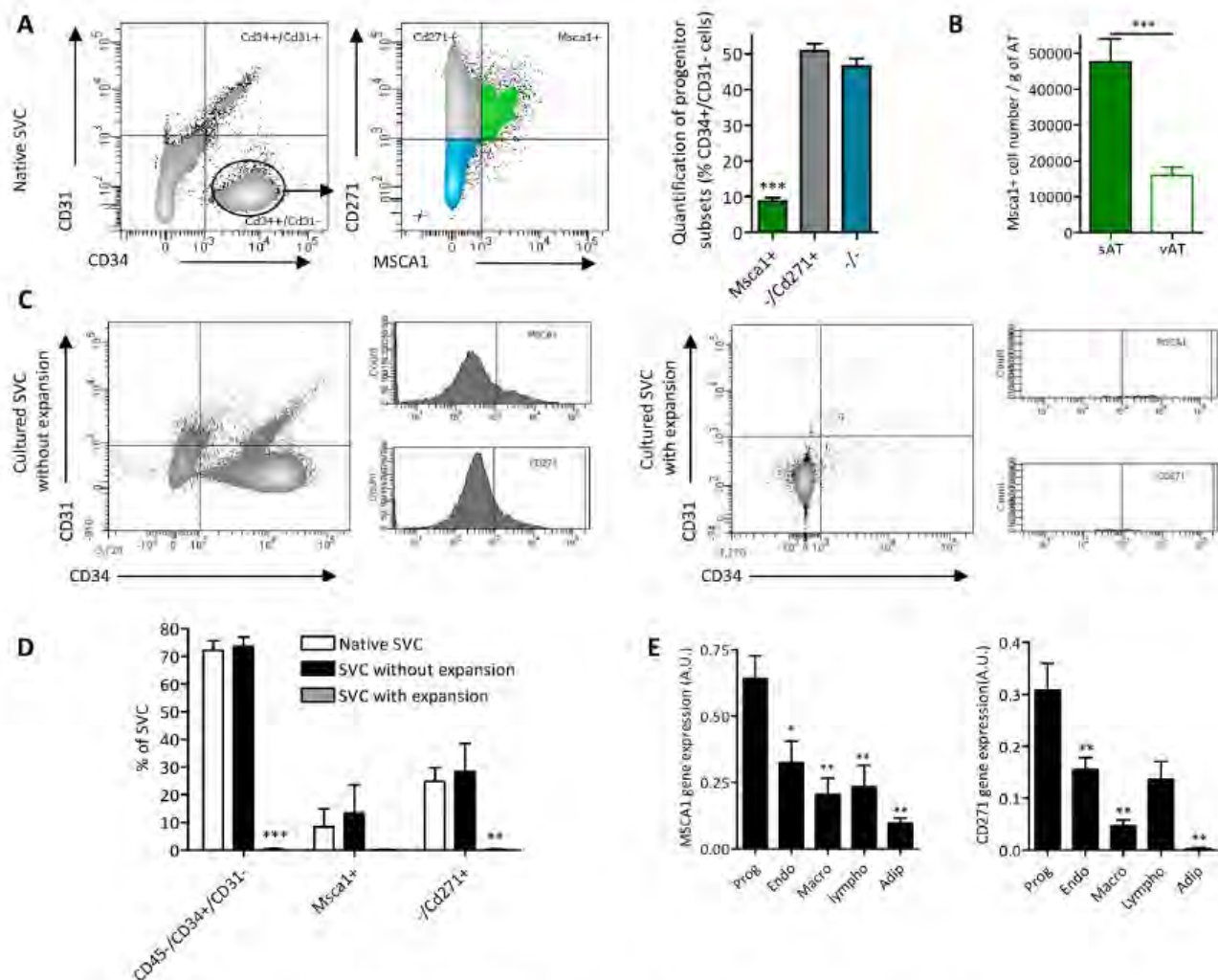


Figure 1: CD45-/CD34+/CD31- progenitor cell population is heterogeneous

Figure Legends

Figure 1: CD45-/CD34+/CD31- progenitor cell population is heterogeneous

(A): Representative dot-plots obtained by flow cytometry analyses with SVC from human sAT from cohort 1 using anti-CD31 and -CD34 antibodies (left) or anti-MSCA1 and -CD271 antibodies gated on CD45-/CD34+/CD31- cells (middle) and quantification of the CD45/CD34+/CD31-/MSCA1+/CD271+ (Mscal+, green), CD45/CD34+/CD31-/MSCA1-/CD271+ (-/Cd271+, grey) and CD45/CD34+/CD31-/MSCA1-/CD271- (-/-, blue) cells (right) (n=53, ***p<0.001 vs -/Cd271+ and -/- subset). **(B):** Quantification by flow cytometry of the number of Mscal+ cells per gram of AT from paired sAT and vAT from morbidly obese women (cohort 2, n=72, ***p<0.001). **(C):** Representative dot-plots obtained by flow cytometry using anti-CD31 and -CD34 antibodies and representative histograms using anti-MSCA1 and -CD271 antibodies gated on CD34+/CD31- cells with SVC seeded at high density and cultured 2 days (left) and SVC seeded at low density and cultured until high density (right). **(D):** Quantifications of CD45-/CD34+/CD31- progenitor cells, Mscal+ and -/Cd271+ progenitor subsets in native SVC, in SVC seeded at high density and cultured 2 days (left) and SVC seeded at low density and cultured until high density (n=3, mean±sem, **p<0.01, ***p<0.001). **(E):** MSCA1 (left) and CD271 (right) gene expression in isolated AT cell populations (Prog: CD45-/CD34+/CD31- progenitor cells, Endo: endothelial cells, Macro: macrophages, Lympho: lymphocytes, Adip: mature adipocytes) (n=4-12, mean±sem, *p<0.05, **p<0.01 vs progenitor cells).

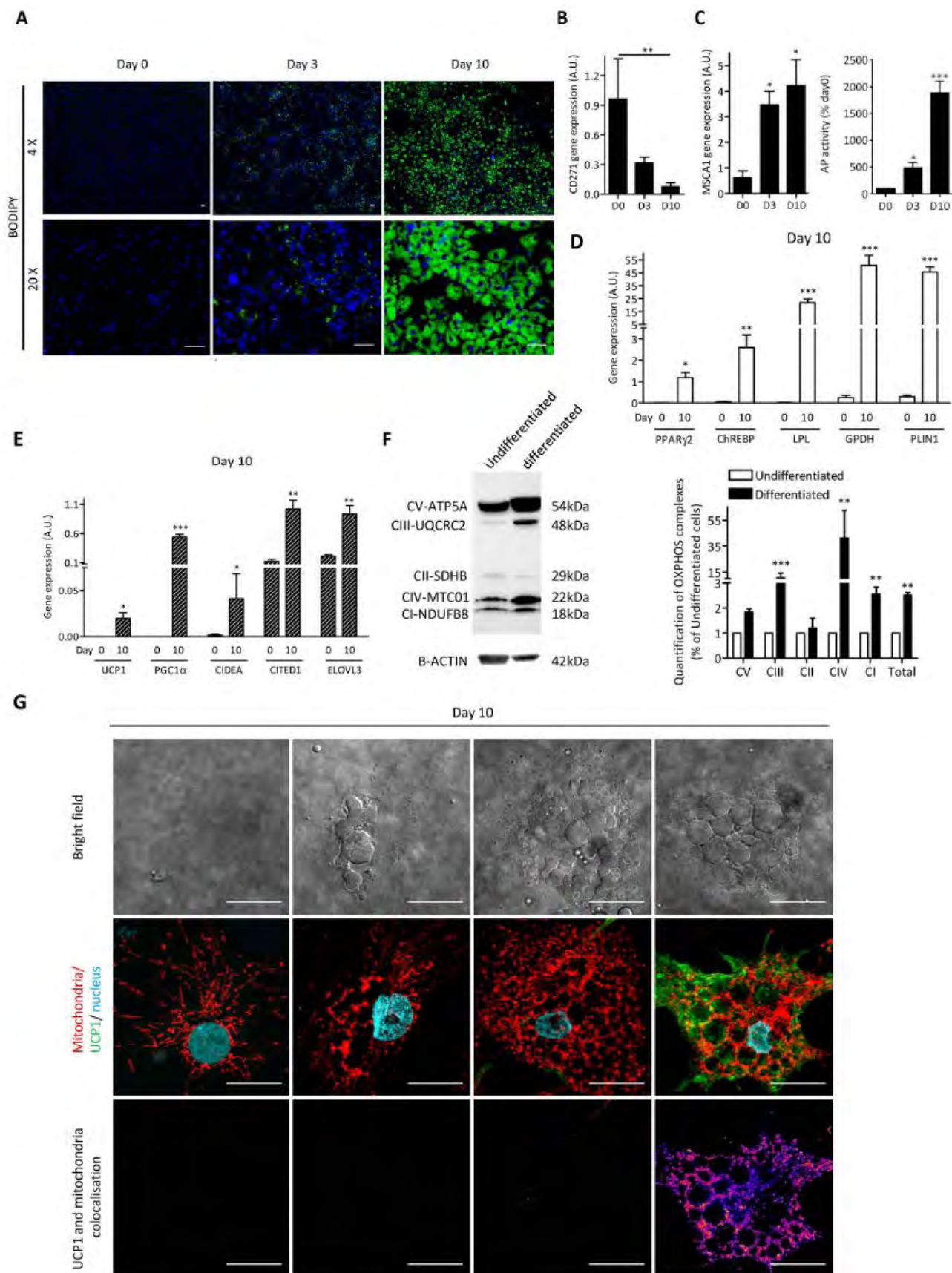


Figure 2: MSCA1 expression and activity increase with adipogenesis induced by rosiglitazone

Figure 2: MSCA1 expression and activity increase with adipogenesis induced by rosiglitazone

CD45-/CD34+/CD31- progenitor cells were cultured under adipogenic conditions for 10 days with an initial 3 day treatment with rosiglitazone. **(A):** Representative microphotographs of lipid accumulation (BODIPY staining, 4X and 20X objectives) at indicated times, scale bar=50 μ m. **(B):** CD271 gene expression in progenitor cells at the indicated times in adipogenic culture conditions (n=6-11, mean \pm sem, **p<0.01). **(C):** MSCA1 gene expression (left) at the indicated times (n=6-11, mean \pm sem, *p<0.05 vs day 0) and alkaline phosphatase (AP) activity (right) at indicated time (n=6-10, mean percentage \pm sem vs day 0, *p<0.05). **(D):** Relative expression of indicated classical adipogenic-related genes and **(E)** brite adipocyte-related genes at the indicated times (n=4-10, mean \pm sem, *p<0.05, **p<0.01, *** p<0.001 vs day 0). **(F):** Representative OXPHOS western blot of undifferentiated and differentiated progenitor cells (left) and quantification of OXPHOS complexes normalized with β -actin (right, n=3, mean percentage \pm sem vs undifferentiated cells, **p<0.01, *** p<0.001). **(G):** Confocal images of chosen progenitor cells according to their lipid droplet content at day 10 brightfield shows lipid droplets (upper), immunohistochemistry for UCP1 (green), mitochondria (red) and nuclei (blue) (middle) and UCP1 and mitochondria colocalisation map (lower), scale bar =20 μ m.

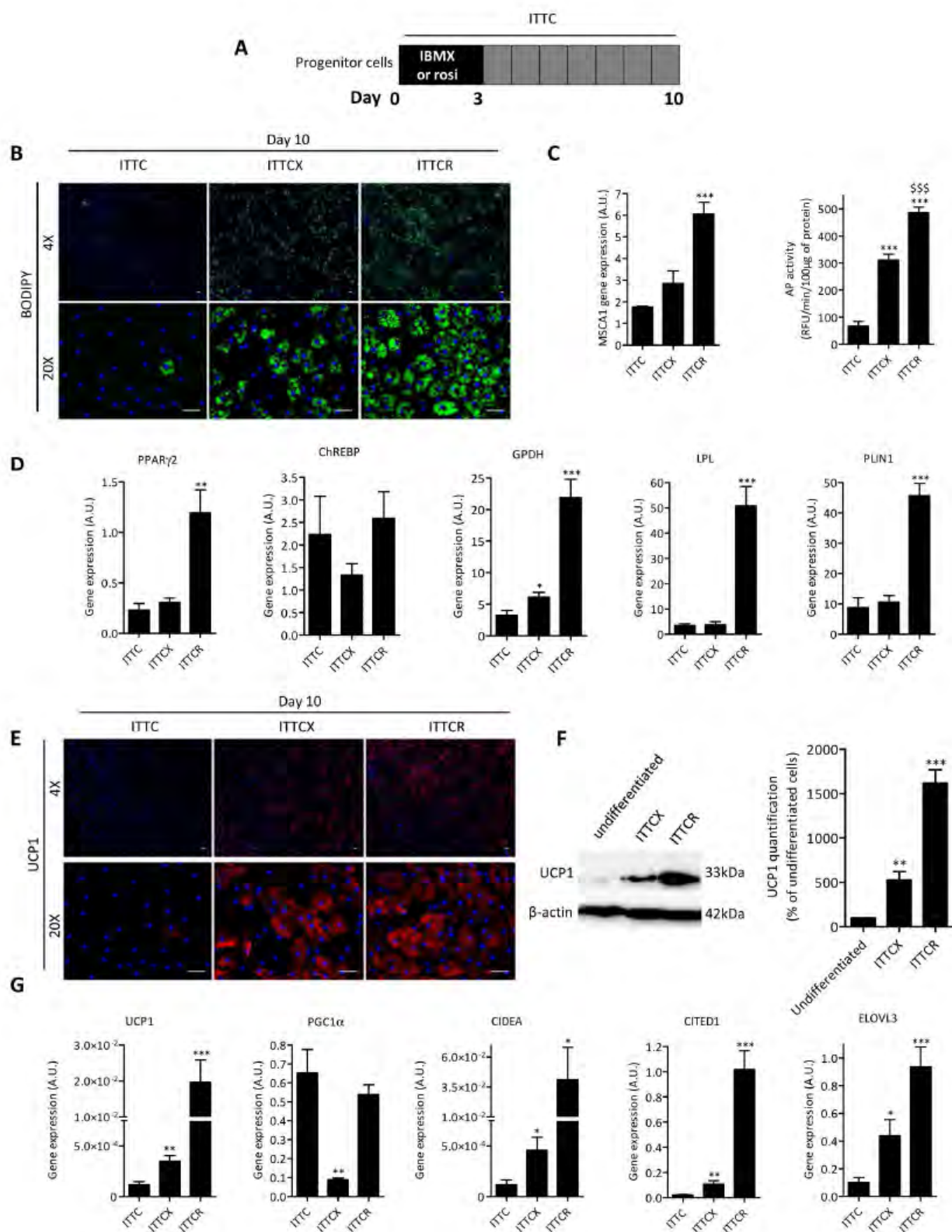


Figure 3: IBMX induces brite adipogenesis and increases MSCA1 expression and activity

Figure 3: IBMX induces brite adipogenesis and increases MSCA1 expression and activity

(A): CD45-/CD34+/CD31- progenitor cells were cultured under basal adipogenic condition (ITTC) for 10 days with an initial 3 day treatment in ITTC alone or supplemented with IBMX (ITTCX) or rosiglitazone (ITTCR). **(B):** Representative microphotographs of lipid accumulation (BODIPY staining, 4X and 20X objectives, scale bar=50 μ m). **(C):** MSCA1 gene expression at day 3 in the indicated adipogenic conditions (left, n=5, mean \pm sem, ***p<0.001 vs ITTC) and alkaline phosphatase (AP) activity at day 3 in the indicated adipogenic conditions (right, n=8, mean \pm sem, ***p<0.001 vs ITTC, \$\$\$p<0.001 vs ITTCX). **(D):** Relative expression of indicated classical adipogenic-related genes at day 10 in the indicated adipogenic conditions (n=4-8, mean \pm sem, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs ITTC). **(E):** Representative microphotographs of UCP1 stainings (4X and 20X objectives) in the indicated adipogenic conditions at day 10, scale bar=50 μ m. **(F):** Representative UCP1 western blot of undifferentiated and differentiated progenitor cells with ITTCX or ITTCR (left) and quantification of UCP1 expression normalized with β -actin (right, n=6, mean percentage \pm sem vs undifferentiated cells, **p<0.01, *** p<0.001). **(G):** Relative expression of indicated brite adipocyte-related genes at day 10 in the indicated adipogenic conditions (n=4-8, mean \pm sem, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs ITTC).

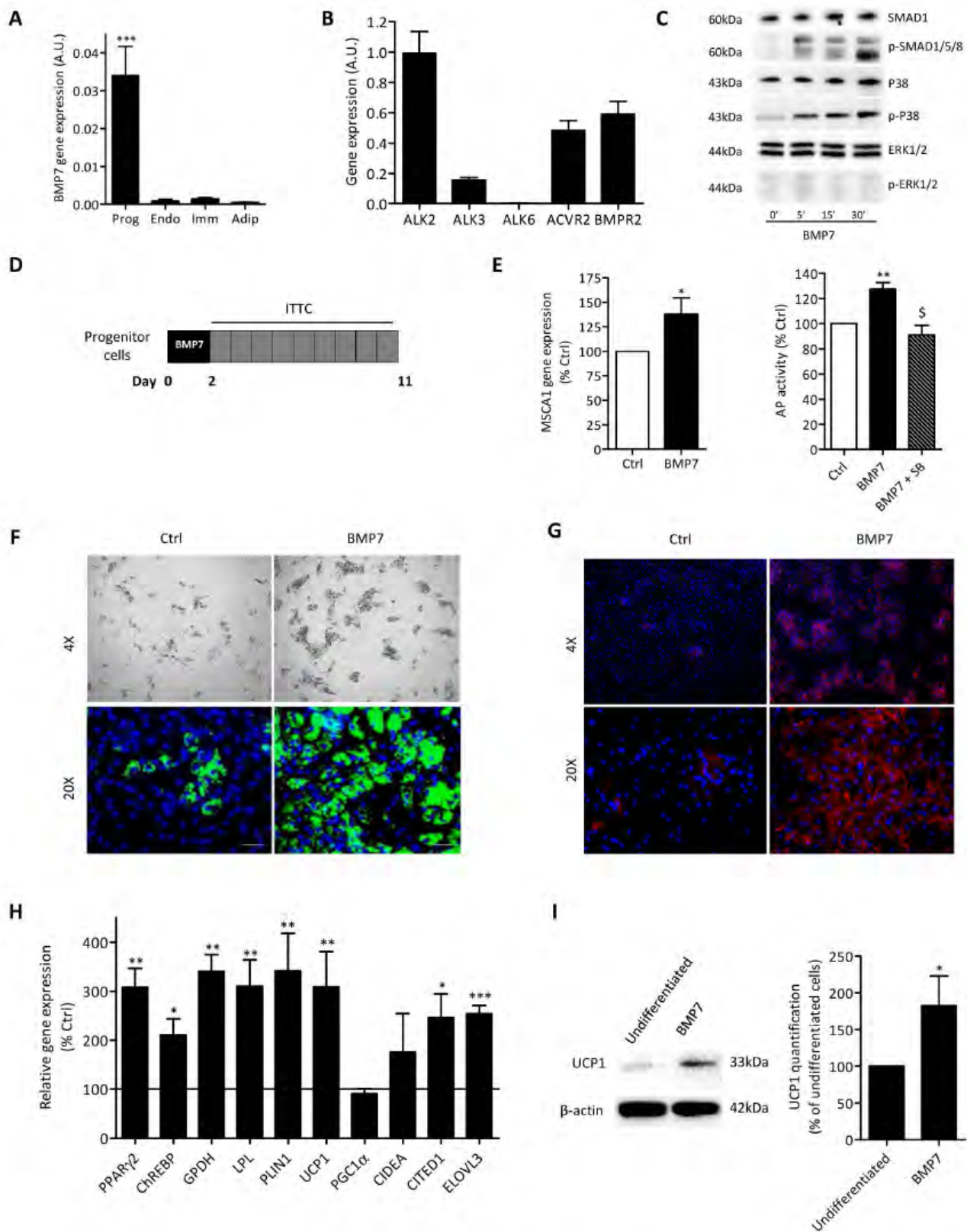


Figure 4: BMP7 is locally expressed by progenitor cells and increases MSCA1 expression and activity

Figure 4: BMP7 is locally expressed by progenitor cells and increases MSCA1 expression and activity

(A): BMP7 gene expression in native isolated AT cell populations: CD45-/CD34+/CD31- progenitor cells (Prog), endothelial cells (Endo), immune cells (Imm) and mature adipocytes (Adip) (n=6, mean±sem, ***p<0.001 prog. vs other cell populations). (B): Relative gene expression levels for the indicated BMP receptors in native progenitor cells (n=12-15, mean±sem). (C): Representative western blot for the indicated proteins involved in BMP7 signaling in progenitor cells treated for the indicated times with BMP7 (50ng/mL). (D): progenitor cells were cultured under adipogenic conditions for 11 days with an initial 2-day BMP7 treatment (50ng/mL). (E): Relative MSCA1 gene expression in progenitor cells after 2 days of BMP7 treatment or untreated cells (control) (left, n=5, mean percentage±sem vs Ctrl, *p<0.05). Alkaline phosphatase (AP) activity, after 2 days of BMP7 treatment, BMP7 with the P38MAPK inhibitor SB203580 or untreated (control) (right, n=4, mean percentage±sem vs Ctrl, **p<0.01 vs Ctrl, \$p<0.05 vs BMP7 treated cells). Representative microphotographs of lipid accumulation (F) (upper brightfield, 4X objective, lower BODIPY staining, 20X objective) and UCP1 stainings (G) (4X and 20X objectives) at day 11 in the indicated adipogenic conditions. (H): Relative expression of indicated genes in progenitor cells treated with BMP7 at day 11 (n=8, mean percentage±sem vs untreated cells, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001). (I): UCP1 western blot of undifferentiated and BMP7-differentiated progenitor cells (left) and quantification normalized with β-actin (right, n=4, mean percentage±sem vs undifferentiated cells, * p<0.05).

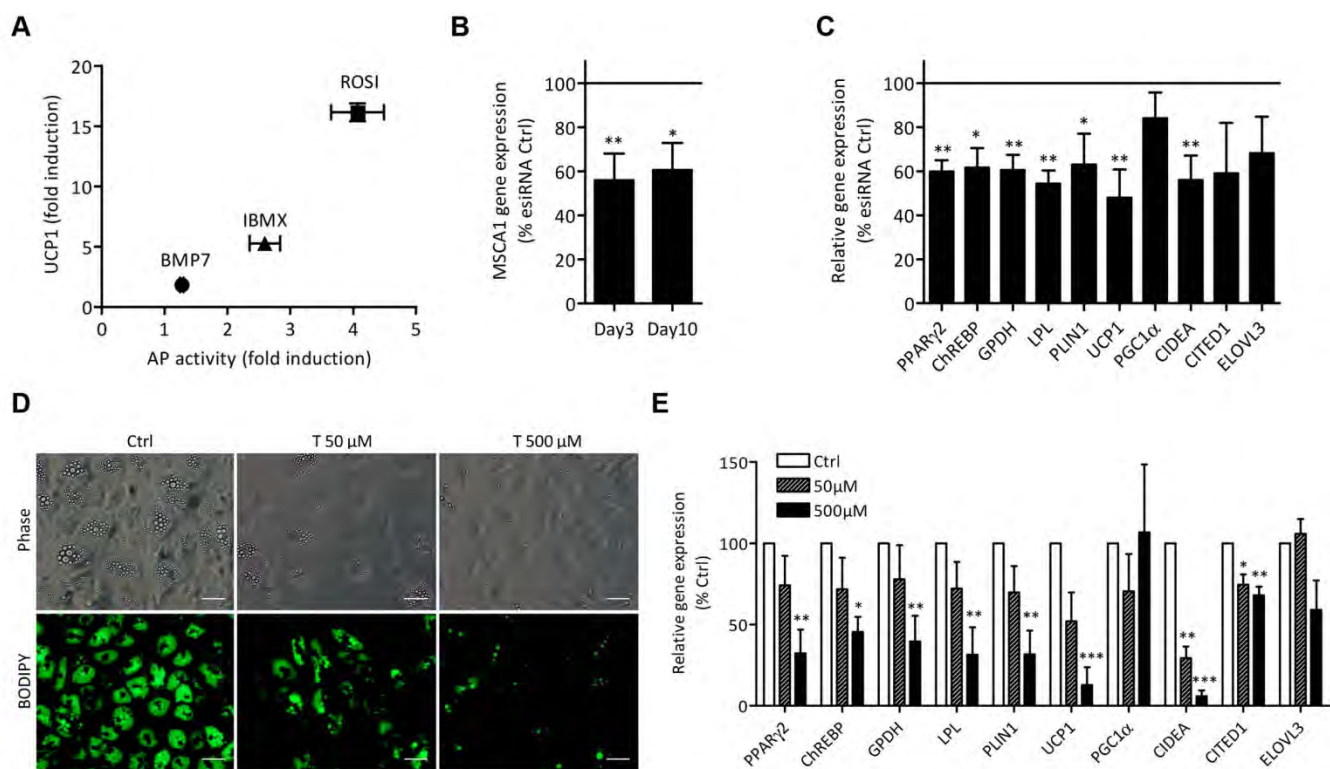


Figure 5: MSCA1 activity is involved in white and brite adipogenesis

Figure 5: MSCA1 activity is involved in white and brite adipogenesis

(A): Association between the level of induction of UCP1 protein at day 10 and MSCA1 alkaline phosphatase (AP) activity (mean \pm sem) after treatment with BMP7 (n=5), IBMX (n=6) or rosiglitazone (n=6). CD45-/CD34+/CD31- progenitor cells were transfected with control esiRNA or esiRNA against MSCA1 and cultured under adipogenic conditions for 10 days with an initial 3 day treatment with rosiglitazone. **(B):** Relative MSCA1 gene expression at day 3 and day 10 (n=5, mean percentage \pm sem vs control cells, *p<0.05, **p<0.01). **(C):** Relative expression of indicated genes at day 10 (n=5, mean percentage \pm sem vs control cells, *p<0.05, **p<0.01). **(D):** Representative microphotographs of BODIPY staining of progenitor cells after 10 days of adipogenic culture conditions with rosiglitazone and treated (or not, control, Ctrl) with increasing concentrations of tetramisole (T, 50-500 μ mol/L, scale bar=50 μ m, 20X objective). **(E):** Relative expression of indicated genes in progenitor cells at day 10 treated with increasing concentrations of tetramisole (Ctrl white, 50 μ M hatched, 500 μ M black) (n=3, mean percentage \pm sem vs Ctrl, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0,001).

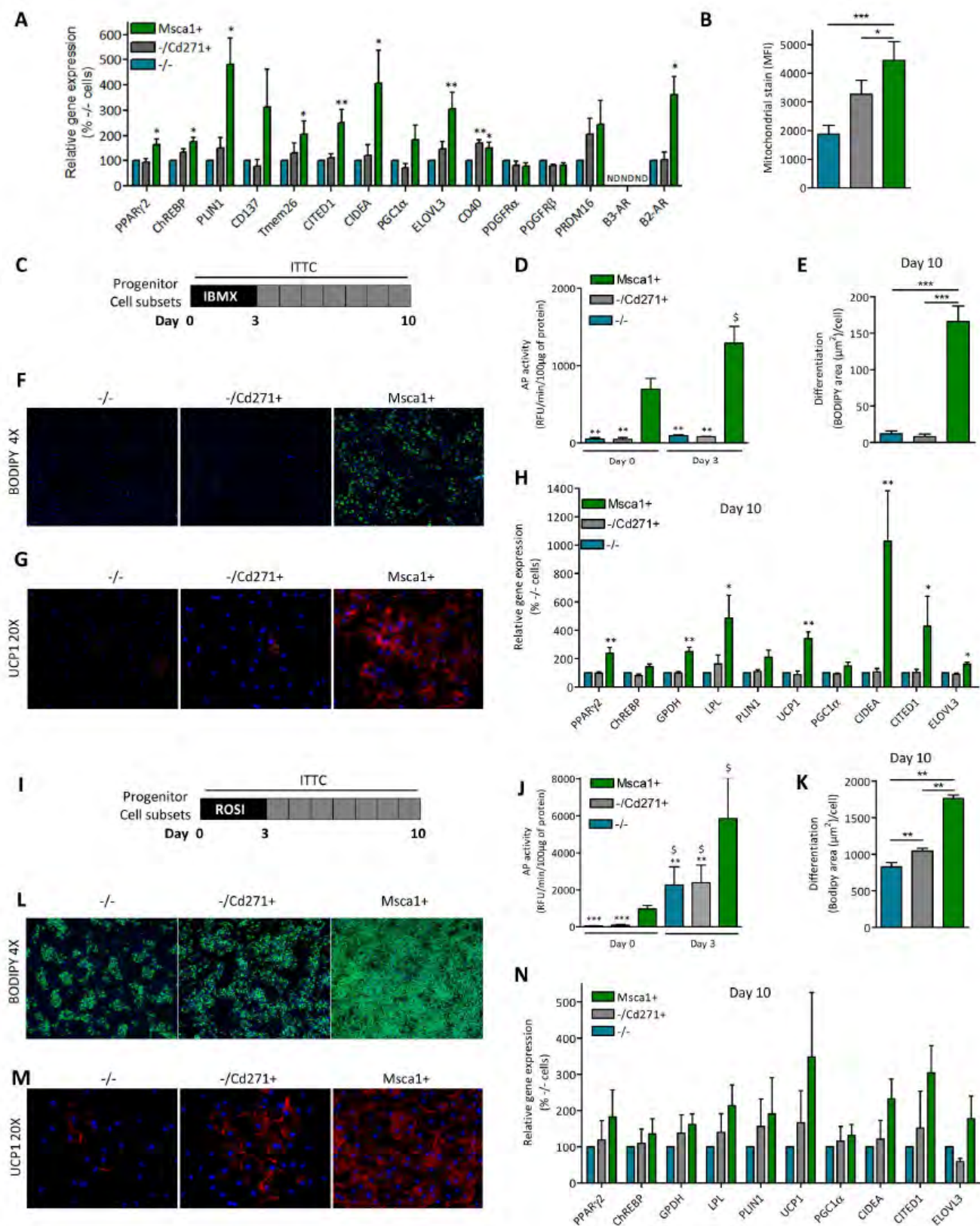


Figure 6: Native isolated Msc1⁺ progenitor subset exhibits brite adipocyte precursor phenotype

Figure 6: Native isolated Msc1+ progenitor subset exhibits brite adipocyte precursor phenotype

(A): Expression of indicated genes in native immunoselected progenitor subsets (n=9-10, mean percentage \pm sem vs -/- subset, *p<0.05, **p<0.01, ND: not detected). (B): Mitochondrial content determined by flow cytometry using Mitotracker mean fluorescence intensity (MFI) in each progenitor subset (n=13, mean \pm sem, *p<0.05, ***p<0.001). (C): Isolated progenitor subsets were cultured under ITTCX conditions for 10 days. (D): Alkaline phosphatase (AP) activity in progenitor subsets at indicated times (n=4, mean \pm sem, **p<0.01, vs Msc1+ subset, \$p<0.05 vs Msc1+ subset at day 0). (E): Quantification of lipid accumulation in progenitor subsets at day 10 (n=4, mean \pm sem, ***p<0.001). Representative microphotographs of lipid accumulation stained with BODIPY (4X objective) (F) and UCP1 stainings (20X objective) (G) in the indicated progenitor subsets at day 10. (H): Relative gene expression in progenitor subsets at day 10 (n=6, mean percentage \pm sem vs -/- subset, *p<0.05, **p<0.01,). (I): Isolated progenitor subsets were cultured under ITTCR conditions for 10 days. (J): Alkaline phosphatase (AP) activity in progenitor subsets at indicated times (n=4, mean \pm sem, **p<0.01, ***p<0.001 vs Msc1+ subset, \$p<0.05 vs respective subset at day 0). (K): Quantification of lipid accumulation in progenitor subsets at day 10 (n=5, mean \pm sem, **p<0.01). Representative microphotographs of lipid accumulation stained with BODIPY (4X objective) (L) and UCP1 stainings (20X objective) (M) in the indicated progenitor subsets at day 10. (N): relative gene expression in progenitor subsets at day 10 (n=3, mean percentage \pm sem vs -/- subset).

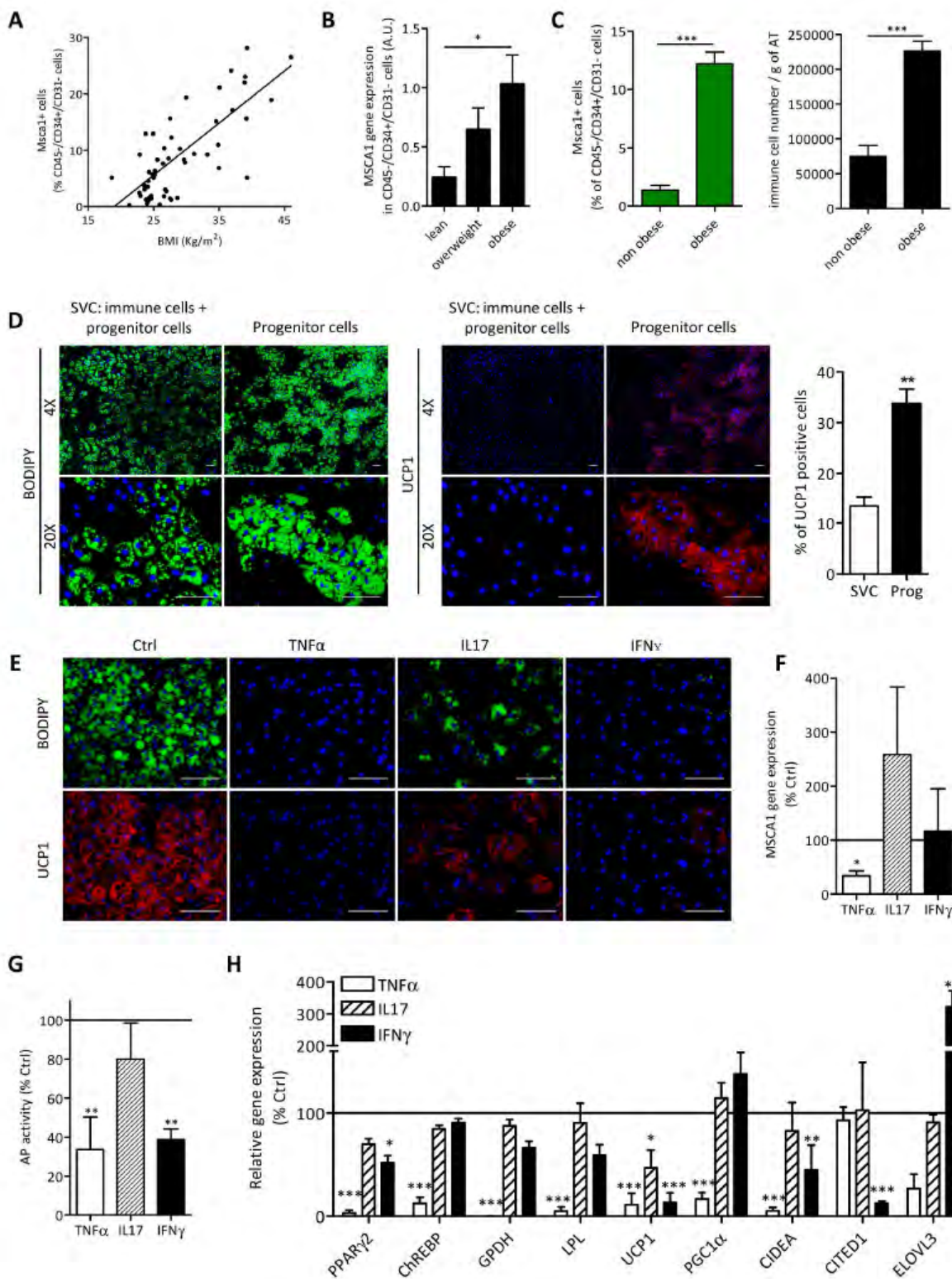
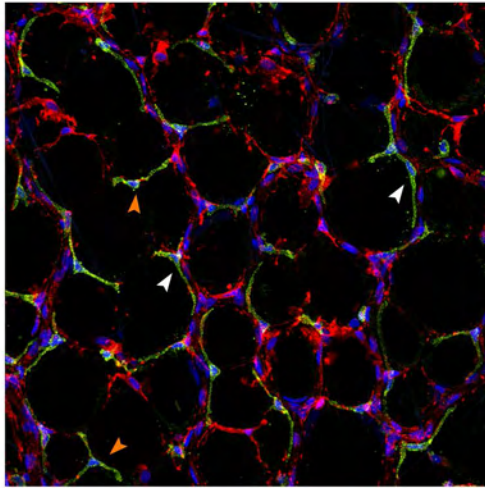


Figure 7: Local inflammation inhibits MSCA1 activity and impairs brite adipogenesis

Figure 7: Local inflammation inhibits MSCA1 activity and impairs brite adipogenesis

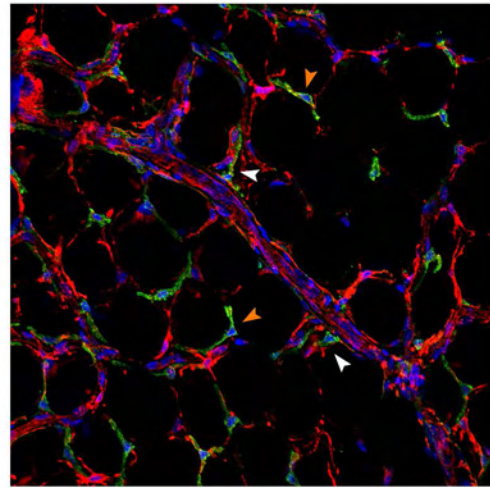
(A): Correlation between BMI (kg/m²) and Msc1+ cells percentage in progenitor cells from cohort 1 determined by flow cytometry (n=55, Spearman correlation test, $r=0.66$, *** $p<0.001$). **(B):** MSCA1 gene expression in progenitor cells isolated from cohort 1 composed of lean (BMI<25Kg/m², n=5), overweight (25Kg/m²<BMI<30Kg/m², n=5) and obese individuals (BMI>30Kg/m², n=10, * $p<0.05$). **(C):** Quantification by flow cytometry of Msc1+ cells percentage in progenitor cells (left) and of immune cells number per gram of AT (right) from cohort 2 (non obese: BMI<28Kg/m², n=24, obese individuals: BMI>35 Kg/m², n=72, *** $p<0.001$). SVC (progenitor and immune cells) or isolated progenitor cells were cultured under ITTCR conditions for 10 days. **(D):** Representative microphotographs of lipid accumulation (BODIPY staining, left) and UCP1 staining (middle) in SVC and progenitor cells at day 10 (4X and 20X objectives, scale bar=100µm) and quantification of UCP1 positive cells (right, n=4, mean percentage±sem, ** $p<0.01$). Progenitor cells were cultured under ITTCR conditions supplemented or not with TNFα, IL17 or IFNγ for 10 days. **(E):** Representative microphotographs of progenitor cells treated with the indicated cytokines (upper, lipid accumulation (BODIPY), lower UCP1 stainings) at day 10 (20X objective, scale bar=100µm). Relative MSCA1 gene expression **(F)** and alkaline phosphatase (AP) activity **(G)** in progenitor cells at day 3 after indicated treatments (n=4, mean percentage±sem of untreated cells, * $p<0.05$, ** $p<0.01$). **(H):** Relative expression of indicated genes at day 10 in progenitor cells treated with TNFα, IL17 or IFNγ (n=4, mean percentage±sem of untreated cells, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

A



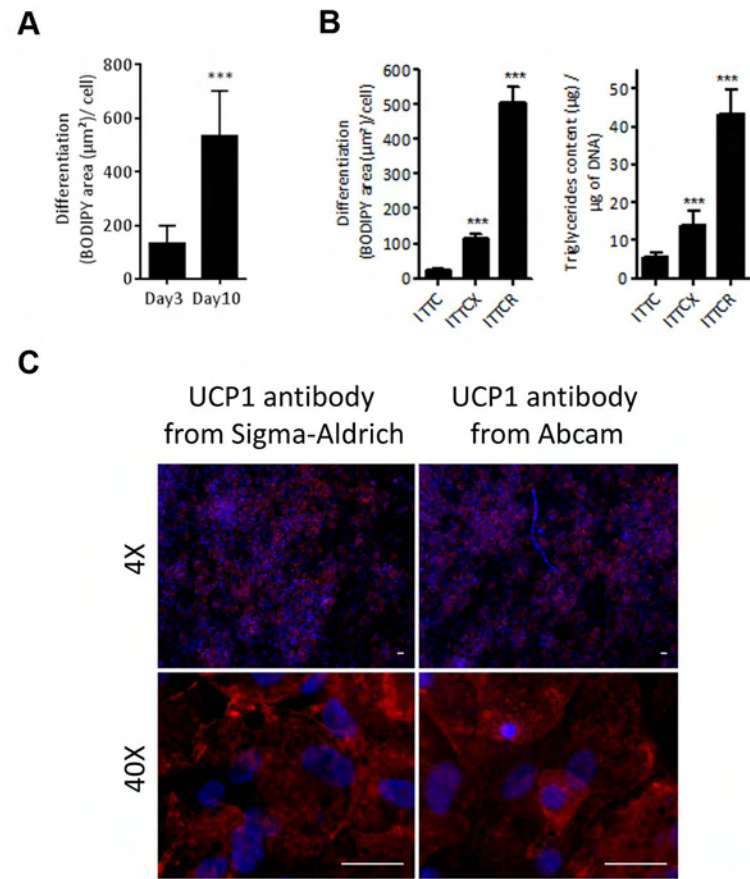
MSCA1 / CD34 / Hoechst

B

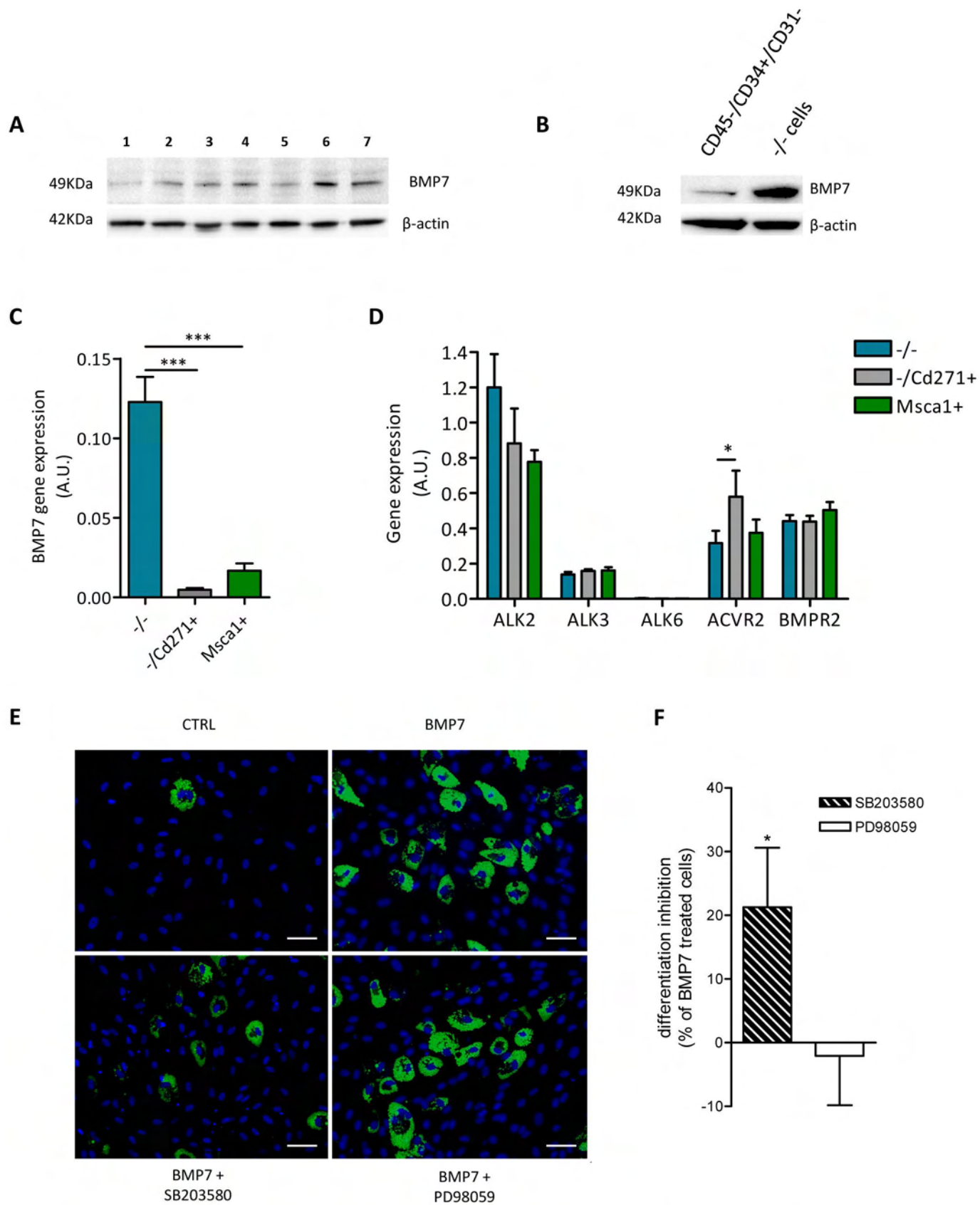


CD271 / CD34 / Hoechst

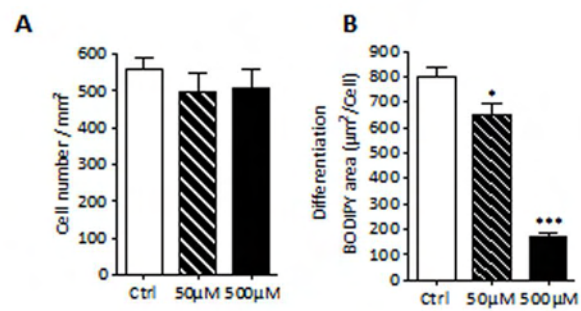
Supplementary Figure 1: MSCA1 and CD271 expression *in situ*



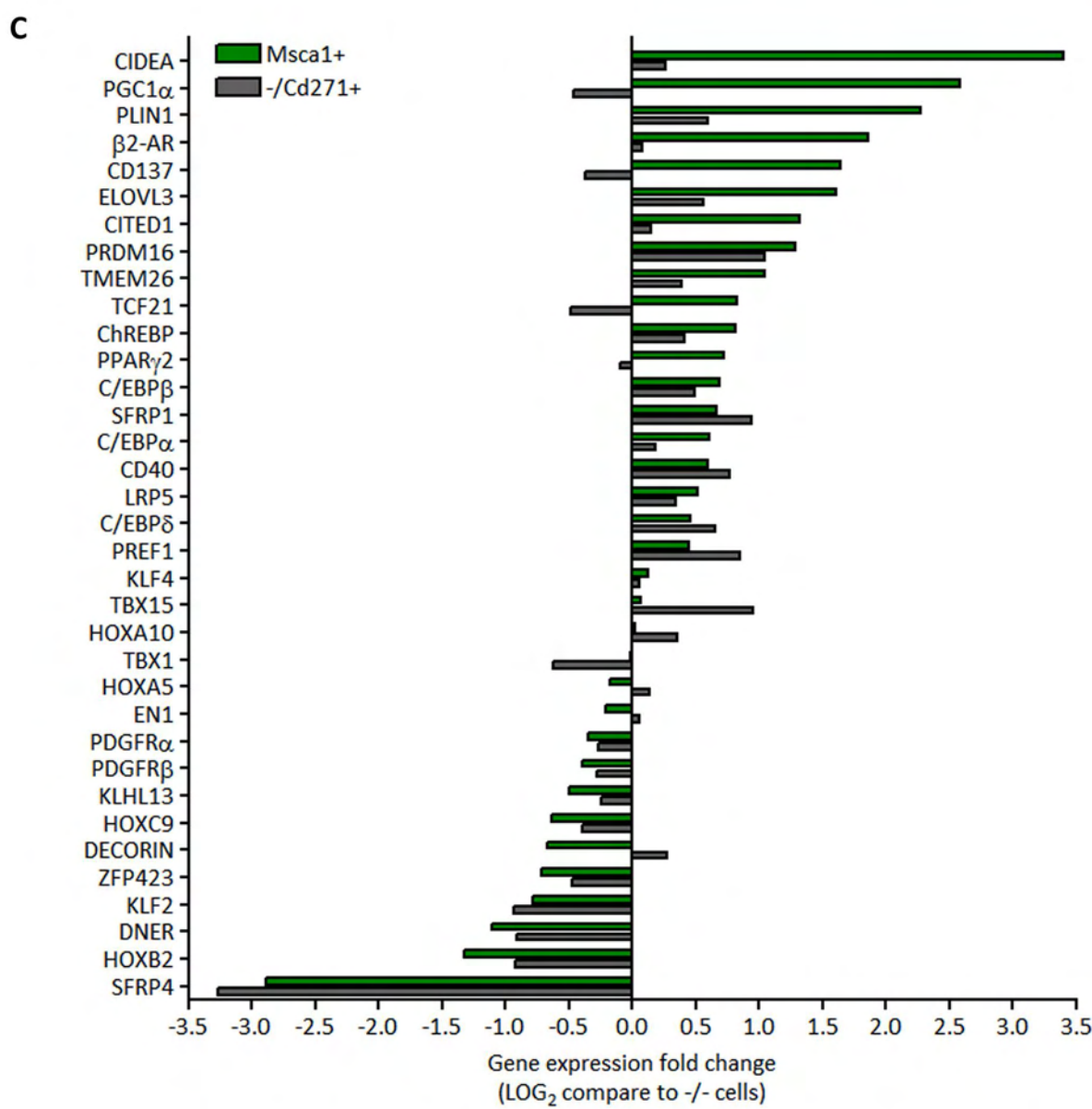
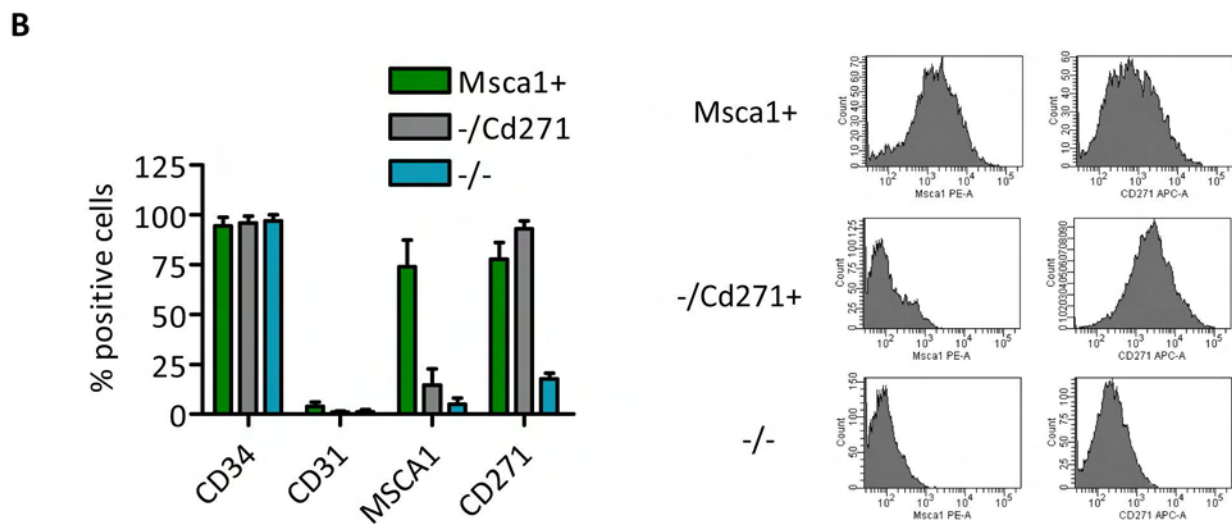
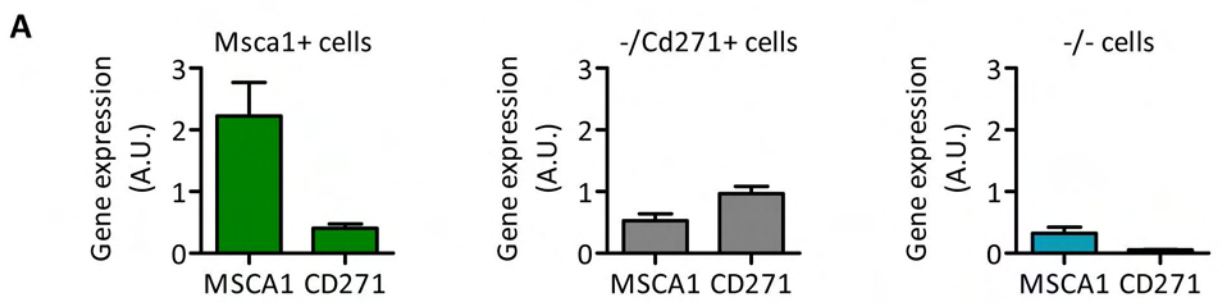
Supplementary Figure 2: Progenitor cells accumulate lipids and express UCP1 upon adipogenic stimulation in vitro



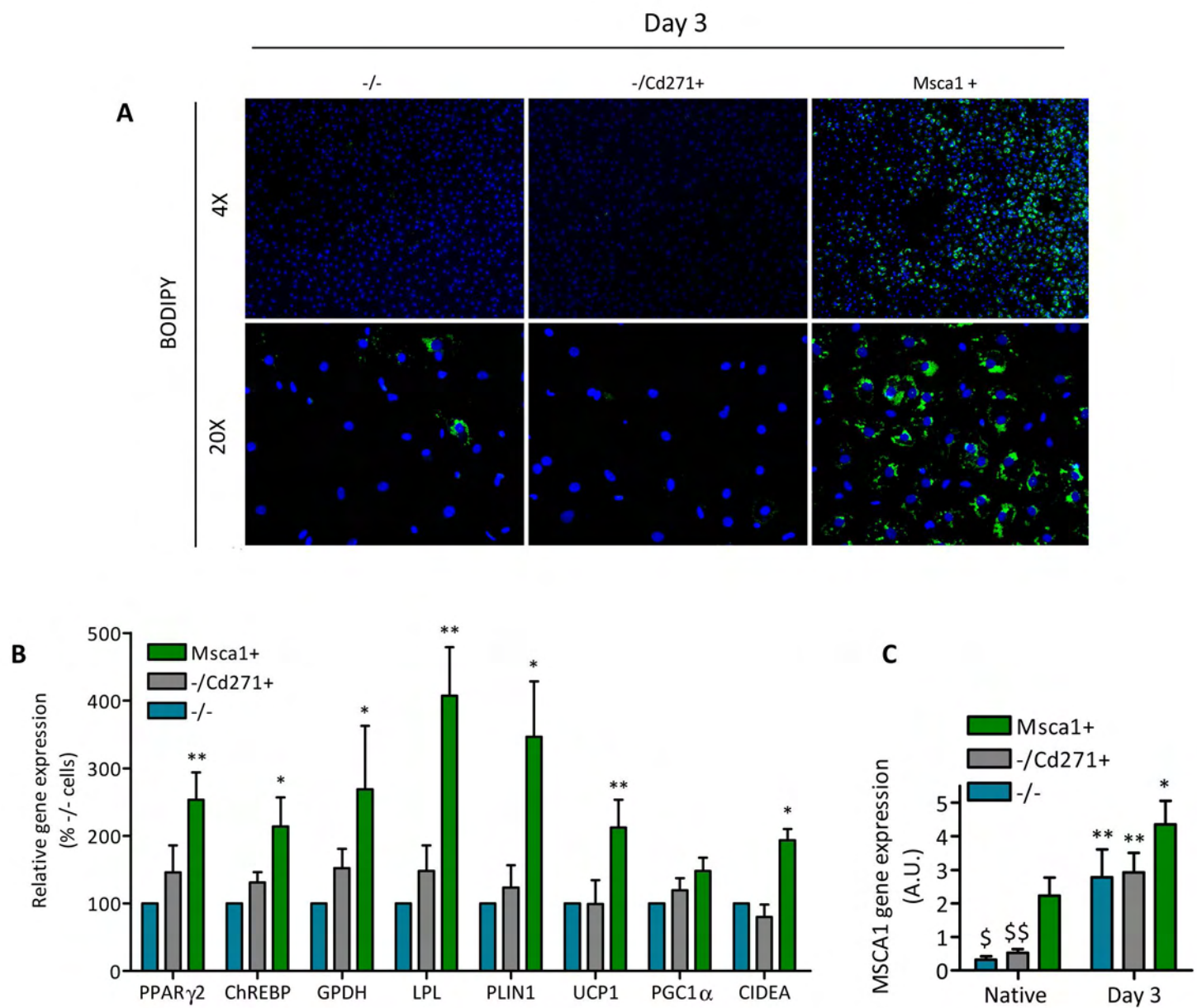
Supplementary Figure 3: BMP7 is produced by -/- progenitor subset



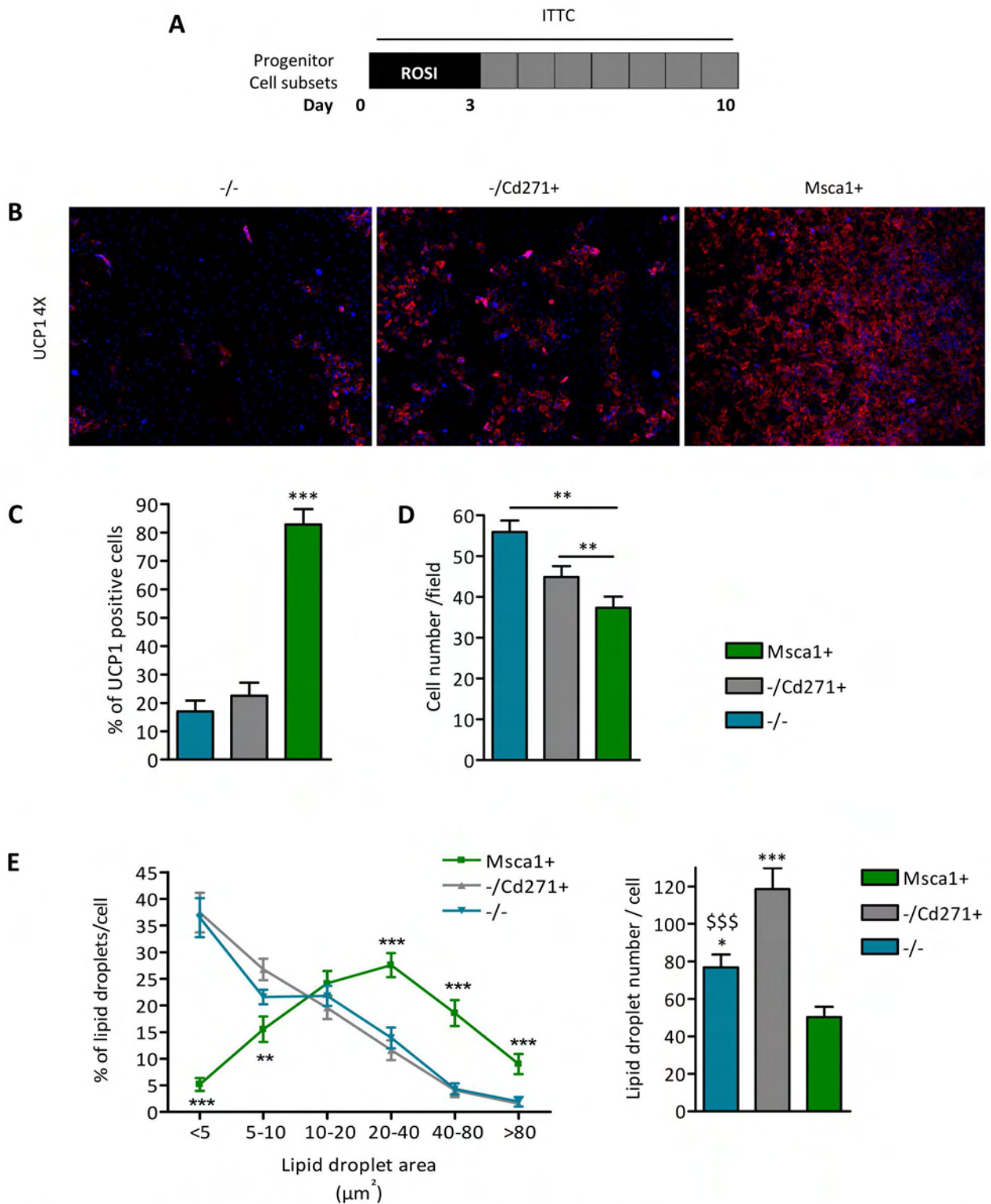
Supplementary Figure 4: Tetramisole inhibits lipid accumulation without toxic effect



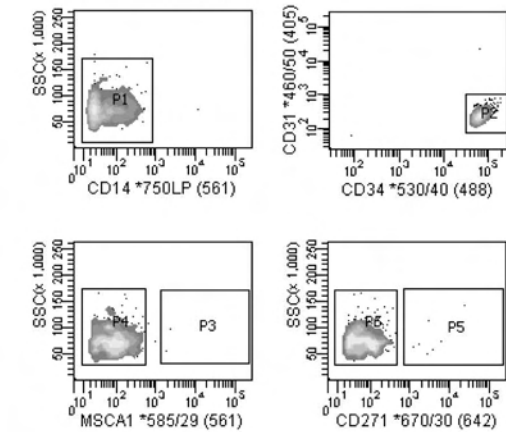
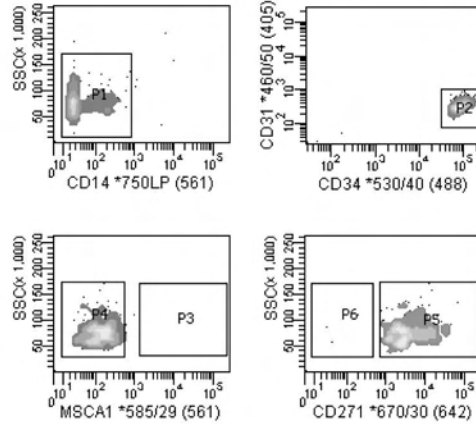
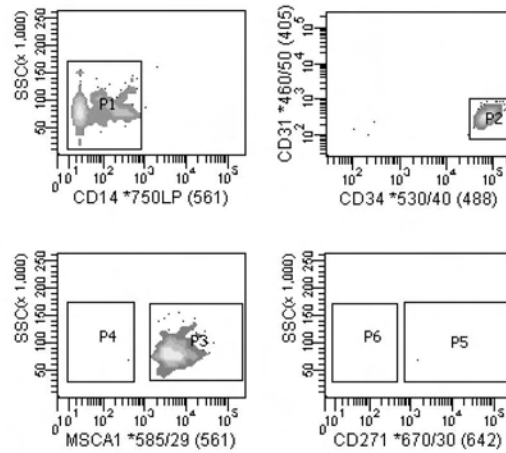
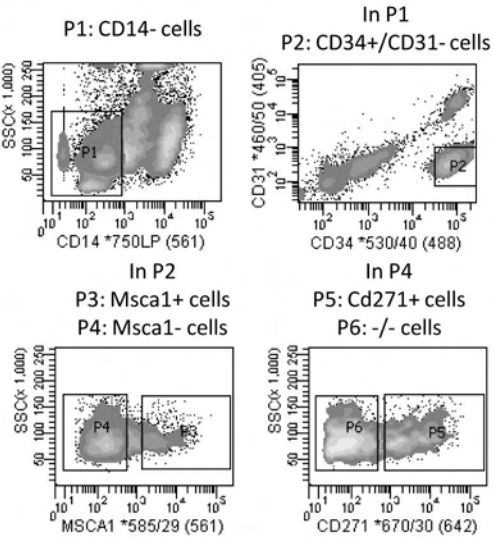
Supplementary Figure 5: Purity of isolated progenitor subsets



Supplementary Figure 6: Adipogenesis is already induced in Msca1+ cell subset at day 3

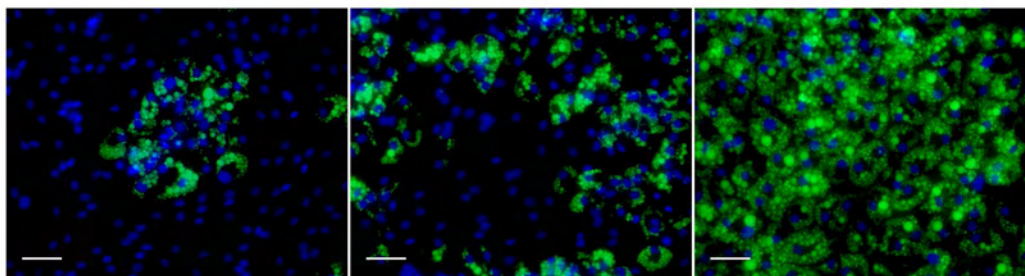


Supplementary Figure 7: -/Cd271+ and -/- progenitor subsets exhibit a delay in brite adipogenesis

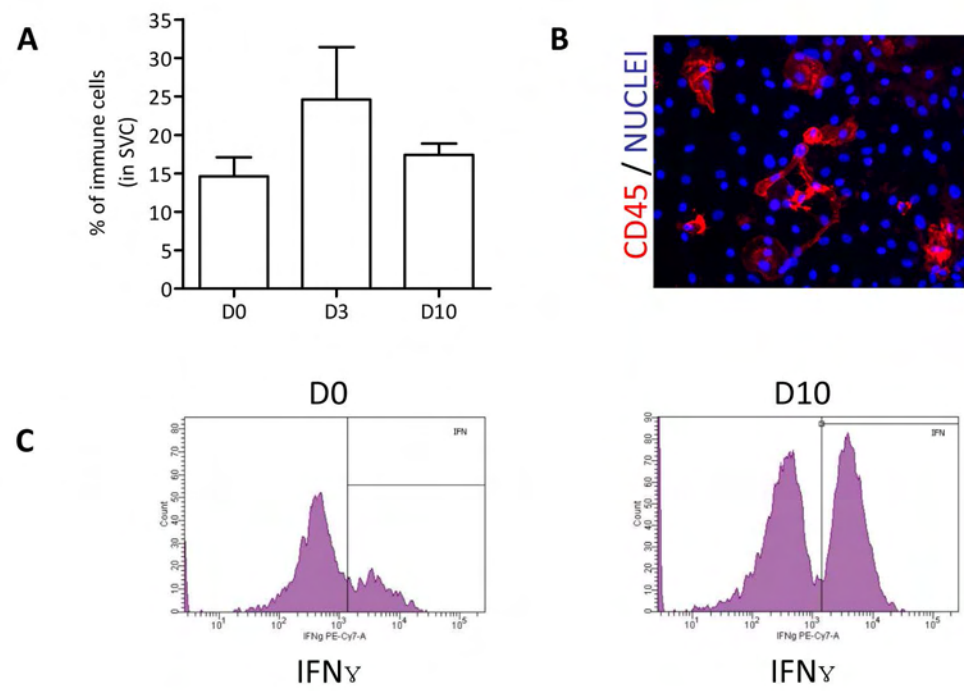


E

-/-	-/Cd271+	Mscd1+
-----	----------	--------



Supplementary Figure 8: Fluorescent activated Cell sorting strategy



Supplementary Figure 9: Immune cells express IFN γ at the end of adipogenic protocol

Supplementary Figure 1: MSCA1 and CD271 expression *in situ*

Confocal images of adipose tissue labeled with anti-MSCA1 (green), -CD34 (red) antibodies and nuclei (blue) **(A)** and -CD271 (green), -CD34 (red) antibodies and nuclei (blue) **(B)**. Magnification X20 white arrow head show cells at perivascular location and orange arrow head show cells at stromal location.

Supplementary Figure 2: Progenitor cells accumulate lipids and express UCP1 upon adipogenic stimulation *in vitro*

CD45-/CD34+/CD31- cells were cultured under adipogenic conditions for 10 days with an initial 3 day treatment with rosiglitazone. **(A)**: Quantification of BODIPY stainings at day 3 and day10. **(B)**: CD45-/CD34+/CD31- cells were cultured under adipogenic conditions for 10 days with or without (ITTC) an initial 3 day treatment with IBMX (ITTCX) or rosiglitazone (ITTCR). Quantification of differentiation by BODIPY stainings (left) and by evaluation of triglycerides content (right). **(C)**: Representative microphotographs of UCP1 stainings (4X and 40X objectives) using UCP1 antibodies commonly used for UCP1 positive cells detection in literature from 2 different suppliers: Sigma-Aldrich and ABCAM.

Supplementary Figure 3: BMP7 is produced by -/- progenitor subset

(A): BMP7 western blot of native CD45-/CD34+/CD31- progenitor cells from 7 individuals from cohort 1. **(B)**: BMP7 western blot of native CD45-/CD34+/CD31- progenitor cells and -/- progenitor cell subset. **(C)**: BMP7 gene expression in native isolated progenitor subsets (n=12, mean±sem, ***p<0.001). **(D)**: relative expression of indicated BMP receptors in native progenitor cell subsets (n=5-13, mean±sem, *p<0.05).

CD45-/CD34+/CD31- progenitor cells were cultured under adipogenic conditions for 11 days with an initial 2 day BMP7 treatment (50ng/mL) supplemented or not with SB203580 (P38MAPK inhibitor, 10μM) or PD98059 (ERK1/2 inhibitor, 10μM). **(E)**: representative microphotographs of CD45-/CD34+/CD31- progenitor cells at day 11 in the indicated adipogenic conditions (20X objective, scale bar=50μm). **(F)**: Quantification of inhibition of progenitor cell differentiation by SB203580 or PD98059 after BMP7 adipogenic culture conditions expressed as the mean percentage (± sem) vs BMP7 treated cells (n=5, *p<0.05).

Supplementary Figure 4: Tetramisole inhibits lipid accumulation without toxic effect

CD45-/CD34+/CD31- progenitor cells were cultured in adipogenic medium containing rosiglitazone and treated or not with 50 or 500 μ M of the alkaline phosphatase inhibitor: tetramisole. Quantification of (A) cell number per mm² and (B) adipogenic differentiation by BODIPY stainings at day 10. Results are expressed as mean \pm sem, n=6, *p<0.05, ***p<0.001 vs Ctrl.

Supplementary Figure 5: Purity of isolated progenitor cell subsets.

(A): MSCA1 and CD271 gene expression in native immunoselected Msca1+ cells (left), -/Cd271+ cells (middle), -/- cells (right). (n=9-10). (B): Quantification by flow cytometry of positive cells in each native immunoselected progenitor cell subset for CD34, CD31, MSCA1 and CD271 (left). Representative flow cytometry histograms (right). (C): Expression of indicated genes in the three native isolated progenitor subsets. The results are expressed as the mean LOG2 fold change between Msca1+ cells (Green) or -/Cd271+ cells (Gray) compared to paired -/- cells. Values <0 indicate lower gene expression compared to -/- subset while values >0 indicate higher gene expression compared to -/- subset. Genes are sorted in decreasing order.

Supplementary Figure 6: Adipogenesis is already induced in Msca1+ cell subset at day 3

Isolated progenitor cell subsets were cultured under adipogenic conditions (ITTC) for 3 day supplemented with rosiglitazone. (A): Representative microphotographs of lipid accumulation stained with BODIPY in progenitor cell subsets at day 3 (4X and 20X objectives). (B): relative gene expression in the indicated progenitor cell subsets at day 3 (n=4, mean percentage \pm sem vs -/- subset, *p<0.05, **p<0.01). (C): MSCA1 gene expression in native progenitor cell subsets and at day 3 (native n=9, day 3 n=6, \$p<0.05, \$\$p<0.01 vs native Msca1+ subset, *p<0.05, **p<0.01 vs respective native subset).

Supplementary Figure 7: -/Cd271+ and -/- progenitor subsets exhibit a delay in brite adipogenesis

(A): Isolated progenitor cell subsets were cultured under adipogenic conditions for 10 days with an initial 3 day treatment with rosiglitazone. (B): Representative microphotographs of UCP1

stainings (4X objective) in progenitor cell subsets at day 10. Quantification of UCP1 positive cells **(C)** and the total cell number **(D)** in progenitor cell subsets at day 10 (n=5, mean percentage±sem, **p<0.01, ***p<0.001 vs other subsets). **(E)**: Distribution of lipid droplet size in Msc1+, -/Cd271+, -/- cells at day 10 (left, mean±sem, **p<0.01, ***p<0.001) and quantification of lipid droplets number per cell (right, *p<0.05, ***p<0.001 vs Msc1+ subset, \$\$\$ p<0.001 vs -/Cd271+).

Supplementary Figure 8: Fluorescent activated Cell sorting strategy

(A): Gating strategy on freshly isolated stroma-vascular cells. Representative dot-plots are shown for each distinct stem in the gating strategy. First, CD14 negative cells (P1, top left) were gated. The CD34+/CD31- cells (P2, top right) were gated into P1. P2 cells were separated with MSCA1 (P3: MSCA1+, P4: MSCA1-, bottom left) and finally the P4 cells were separated based on the presence of CD271 (P5: CD271+, P6: CD271-, bottom right). Purity of sorted MSCA1+ **(B)**, -/CD271+ **(C)** and -/- **(D)** cells shown by representative dot-plots corresponding to the different cell surface markers (n=3 for all subsets). **(E)**: Sorted progenitor cell subsets were cultured under brite adipogenic conditions for 10 days with rosiglitazone for the 3 first days. Representative photographs of fluorescence microscopy with BODIPY staining (scale bar=50µm).

Supplementary Figure 9: Immune cells express IFNγ at the end of adipogenic protocol

SVC were cultured under adipogenic conditions for 10 days with an initial 3 day treatment with rosiglitazone. **(A)**: Quantification by flow cytometry of the percentage of immune cells (CD45+ cells) in SVC at indicated times (n=3, mean±sem). **(B)**: Representative microphotographs of CD45 (red) and nuclei (blue) stainings (20X objective) in SVC at day 10. **(C)**: Representative histograms of IFNγ expression determined by flow cytometry in SVC before adipogenic induction (day 0, left) and at the end of differentiation (day 10, right).

Supplementary Table 1: non obese women parameters from cohort 2

parameters	mean \pm se	minimum value	maximum value
number of women	24		
Age (years)	43,6 \pm 8.8	21	59
Weight (Kg)	63,5 \pm 9.4	45	82
BMI(Kg/m ²)	23,7 \pm 2,8	18,7	28
Waist (cm)	82,9 \pm 9	70	99
Hip (cm)	95,9 \pm 9.4	78	108
Waist/Hip ratio	0,87 \pm 0,07	0,77	0,97
Fasting glucose (mmol/L)	5,04 \pm 0,4	4,24	5,78
HbA1C %	5,37 \pm 0,37	4,5	5,9
CRP (mg/L)	2.95 \pm 3,9	0,1	15
Triglycerides (mmol/L)	0,89 \pm 0,46	0,48	2,48
Total cholesterol (mmol/L)	5,17 \pm 1,23	3,36	8,67
HDL cholesterol (mmol/L)	1,56 \pm 0,49	0,93	2,79
LDL cholesterol (mmol/L)	3,2 \pm 0,88	2,12	5,9
γ Glutamine Transaminase (U/L)	15.95 \pm 5,05	8	24
Alanine Transaminase (U/L)	15,4 \pm 8.89	7	55
Aspartate transaminase (U/L)	17.9 \pm 4.97	11	34
Number of subject with fasting glycemia \geq 6,1 mmol/L	0		
Number of subject with high triglyceridemia (>1,7 mmol/L)	1		
Number of subject with HDL level(>1,29 mmol/L)	1		
Number of subject with arterial hypertension (>140 mm Hg)	1		
Number of subject with metabolic syndrome	0		

Supplementary Table 2: morbidly obese women parameters from cohort 2

parameters	mean \pm se	minimum value	maximum value
number of women	72		
Age (years)	40.60 \pm 9.58	24	59
Weight (Kg)	121.1 \pm 18.9	72,3	177,2
BMI(Kg/m ²)	44,9 \pm 6.4	33,3	62,8
Waist (cm)	119.88 \pm 14.34	96	152
Hip (cm)	130.24 \pm 13.11	99	169
Waist/Hip ratio	0,92 \pm 0,11	0,66	1,31
Fasting glucose (mmol/L)	5,42 \pm 0.87	4,3	10.6
Fasting Insulin (mmol/L)	18.28 \pm 9.38	1	51,7
HOMA index	4.80 \pm 3.36	0,49	23.65
HbA1C %	5.79 \pm 0.54	4.6	8.5
CRP (mg/L)	9,96 \pm 5.68	2	27
Triglycerides (mmol/L)	1,30 \pm 0.81	0,45	4,34
Total cholesterol (mmol/L)	5,32 \pm 0,88	3.33	7.61
HDL cholesterol (mmol/L)	1,22 \pm 0.30	0,6	2,0
LDL cholesterol (mmol/L)	3,52 \pm 0,79	2.0	5.60
γ Glutamine Transaminase (U/L)	39.10 \pm 24.61	14	157
Alanine Transaminase (U/L)	32.06 \pm 17.17	11	96
Aspartate transaminase (U/L)	22.83 \pm 10.13	10	68
Food intake per day (kCal)	1852 \pm 456	1028	3061
Number of subject with fasting glycemia \geq 6,1 mmol/L	10		
Number of subject with high triglyceridemia (>1,7 mmol/L)	15		
Number of subject with HDL level(>1,29 mmol/L)	30		
Number of subject with arterial hypertension (>140 mm Hg)	14		
Number of subject with metabolic syndrome	31		
Number of subject with HOMA-IR<3.5	31		
Number of subject with HOMA-IR>3.5	41		

Supplementary Table 3: Real Time PCR Primers

ACVR2	Hs00155658_m1	HOXB2	Hs00609873_g1
ADRB2	Hs00240532_s1	HOXC9	Hs00396786_m1
ADRB3	Hs00609046_m1	IFN γ	Hs00174143_m1
ALK2	Hs00153836_m1	KLF2	Hs00360439_g1
ALK3	Hs00831730_s1	KLF4	Hs00358836_m1
ALK6	Hs00176144_m1	KLH13	Hs01006506_m1
BMP7	Hs00233476_m1	LPL	Hs00173425_m1
BMPR2	Hs00176148_m1	LRP5	Hs00182031_m1
CD3G	Hs00962186_m1	LYVE1	Hs00272659_m1
CD14	Hs00169122_g1	MSCA1	Hs01029144_m1
CD137	Hs00155512_m1	PDGFR α	Hs00998018_m1
CD206	Hs00267207_m1	PDGFR β	Hs00182163_m1
CD271	Hs00182120_m1	PGC1 α	Hs01016719_m1
CD40	Hs00374176_m1	PLIN1	Hs00160173_m1
CEBP α	Hs00269972_s1	PPAR γ 2	Hs01115510_m1
CEBP β	Hs00270923_s1	PRDM16	Hs00922674_m1
CEBP δ	Hs00270931_s1	PREF_1	Hs01086976_m1
ChREBP	Hs00263027_m1	SFRP1	Hs00610060_m1
CIDEA	Hs00154455_m1	SFRP4	Hs00180066_m1
CITED1	Hs00918445_g1	TBX1	Hs00271949_m1
DECORIN	Hs01081925_m1	TBX15	Hs00537087_m1
DNER	Hs01039911_m1	TCF21	Hs00162646_m1
ELOVL3	Hs00537016_m1	TMEM26	Hs00415619_m1
EN1	Hs00154977_m1	TNF α	Hs00174128_m1
GPDH	Hs00193386_m1	UCP1	Hs00222453_m1
HOXA10	Hs00172012_m1	ZFP423	Hs00323880_m1
HOXA5	Hs00430330_m1		

Supplementary methods

Triglyceride content quantification.

After adipogenic differentiation, cells were lysed using lysis buffer (Tris 10mM/EDTA 1mM/0.1% Triton-X100) and sonication. Triglyceride dosage was performed using TG PAP 1000 kit from Biomerieux according to manufacturer instructions.

DNA content was evaluated using Picogreen® (Life Technologies) to normalize triglyceride accumulation by cell number.

Nos résultats suggèrent que BMP7 pourrait être considérée comme un régulateur endogène de l'adipogenèse chez l'homme. En effet, jusqu'à présent, peu de régulateurs positifs de l'adipogenèse sont connus, la majorité des signaux étant anti-adipogéniques.

Quatrième partie : expression génique de BMP7 dans le TA sous-cutané abdominal en fonction de l'obésité et dans les TA sous-cutané abdominal et viscéral chez l'obèse.

Afin de mieux caractériser la production locale de BMP7, son expression génique a été analysée en fonction de l'indice de masse corporelle (IMC), de la localisation tissulaire et de l'insulino-résistance. L'expression génique de BMP7 dans le TA sous-cutané abdominal ne varie pas en fonction de l'IMC des individus (allant de 21 à 44 kg/m²) (Figure 22A). BMP7 étant exprimée uniquement par les cellules progénitrices, nous avons ensuite déterminé son expression dans les cellules progénitrices natives isolées de TA sous-cutané abdominal en fonction de l'IMC (de 18 à 39kg/m²). Une corrélation positive entre l'expression de BMP7 et l'état d'obésité est observée (Figure 22B). L'expression de BMP7 a ensuite été analysée en fonction de la localisation tissulaire sous-cutanée abdominale et viscérale (omental) provenant de biopsies d'individus obèses morbides ayant un indice d'insulino-résistance (HOMA-IR) compris entre 2.54 et 8.90. Compte tenu de la faible quantité de tissus disponible qui limite l'isolement des différentes populations cellulaires de la FSV et fort de l'absence d'expression de BMP7 dans les adipocytes matures, l'expression de BMP7 a été déterminée dans les cellules de la FSV totale. L'expression de BMP7 est plus importante dans les cellules du TA viscéral que sous-cutané (Figure 22C). Cependant, aucune modulation n'est observée en fonction du HOMA-IR (Figure 22D).

En résumé, nous avons montré que BMP7 est exprimée spécifiquement par les cellules progénitrices CD271-/MSCA1- et est capable d'induire l'engagement (augmentation de MSCA1) et la différenciation brite. De façon intéressante, l'expression de BMP7 par les cellules progénitrices augmente avec l'obésité. Nous pouvons émettre l'hypothèse que BMP7 participe à l'engagement des cellules progénitrices, participant à l'augmentation du nombre de cellules

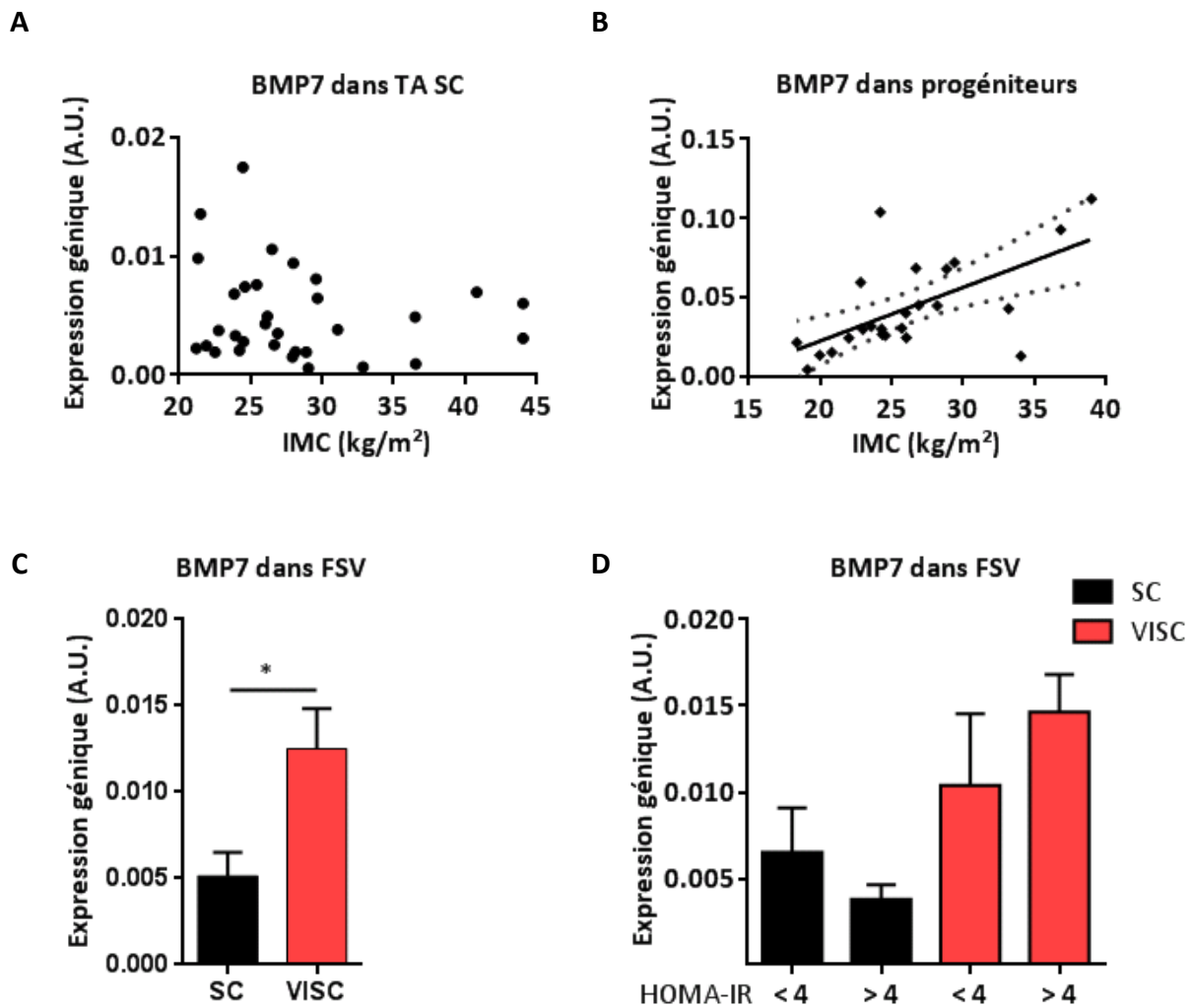


Figure 22 : Influence de l'obésité, la localisation tissulaire et l'insulino-résistance sur l'expression génique de BMP7 dans le TA humain.

- A) Expression génique de BMP7 dans le TA sous-cutané abdominal entier en fonction de l'indice de masse corporelle (IMC, en kg/m²), n=32, test de corrélation Spearman, non significatif.
- B) Expression génique de BMP7 dans les cellules progénitrices CD34+/CD31- natives, isolées du TA sous-cutané abdominal, en fonction de l'indice de masse corporelle (IMC, en kg/m²), n=24, test de corrélation Spearman, p=0.0023, r=0.5930.
- C) Expression génique de BMP7 dans les cellules de la FSV natives, isolées de TA appariés sous-cutané abdominal (SC) et viscéral (VISC) appariés d'individus obèses. n=10, moyenne ± SEM. T test, *p<0.05.
- D) Expression génique de BMP7 dans les cellules de la FSV isolées de TA sous-cutané abdominal (SC) et viscéral (VISC) appariés d'individus obèses en fonction de l'indice d'insulino-résistance des patients (HOMA-IR < 4, n=5 ; HOMA-IR > 4, n=5) (t test par localisation selon le HOMA-IR, non significatif).

MSCA1+ avec l'obésité. La présence accrue des macrophages et lymphocytes avec l'obésité conduit au blocage de la différenciation et à l'accumulation des cellules MSCA1+. De façon surprenante, alors que peu de cellules MSCA1+ sont présentes dans le TA viscéral, l'expression génique de BMP7 dans les cellules de la FSV de ce TA est supérieure à celle des cellules du TA sous-cutané. Une des différences entre ces deux localisations est la quantité de cellules immunes. Il serait intéressant d'évaluer les effets des cytokines inflammatoires sur l'expression de BMP7. Si les sécrétions des cellules immunes stimulent son expression, on peut imaginer que les lymphocytes et/ou les macrophages induisent une « compensation » de leur effet anti-adipogénique, peut-être lors de la phase de prise de poids, qui serait ensuite inefficace lorsque le nombre (et/ou le changement de phénotype) des cellules immunes devient trop important. La régulation de BMP7 par les sécrétions des adipocytes provenant d'individus normo-pondérés, en surpoids et obèses, et même en fonction de leur hypertrophie, pourrait également être étudiée. L'ensemble de ces résultats suggère que BMP7 peut être considérée comme un composant du microenvironnement du TA et un régulateur endogène de l'adipogenèse chez l'homme.

Nous avons mis en évidence que BMP7 est exprimée dans le TA humain par un sous-type de progéniteur et que son expression est modulée en fonction de l'état d'obésité. En accord avec les données de la littérature (Tseng et al., 2008; Pisani et al., 2011; Schulz et al., 2011; Elsen et al., 2014), BMP7 induit l'adipogenèse dans les voies adipocytaires blanche et brite.

Cinquième partie : rôles des BMP2 et BMP4 sur l'adipogenèse humaine et leur relevance physiologique.

Introduction

Chez la souris, BMP2 et BMP4 induisent l'engagement (Ahrens et al., 1993; Hata et al., 2003; Tang et al., 2004; Huang et al., 2009) et la différenciation adipocytaire (Ji et al., 2000; Sottile and Seuwen, 2000) dans la voie blanche. Les effets de BMP4 sur l'adipogenèse brite chez la souris (Tseng et al., 2008; Qian et al., 2013; Xue et al., 2014), comme chez l'homme (Gustafson and Smith, 2012; Elsen et al., 2014), sont controversés. En revanche, le rôle de BMP2 sur l'adipogenèse blanche et brite chez l'homme n'a pas été déterminé. Concernant la production de ces BMPs dans le TA, peu de données sont disponibles. BMP4 est exprimée et sécrétée par les cellules de la FSV et les cellules progénitrices de TA sous-cutané humain différenciées (Gustafson and Smith, 2012; Elsen et al., 2014), mais les régulations de cette expression ne sont pas connues.

Dans un premier temps, nous avons évalué les effets des BMP2 et BMP4 sur l'adipogenèse blanche et brite des cellules progénitrices humaines. Ensuite, les expressions géniques de ces BMPs ont été déterminées dans les différentes populations cellulaires isolées du TA sous-cutané provenant d'individus ayant un IMC varié. Enfin, les variations de leurs expressions chez des individus obèses selon la localisation tissulaire, sous-cutanée abdominale et viscérale, et selon l'indice d'insulino-résistance (HOMA-IR) ont été étudiées.

Matériels et méthodes

Les TA sous-cutanés abdominaux ont été obtenus à partir de la cohorte décrite dans la section « matériels et méthodes » de l'article précédent « Human white and brite adipogenesis is supported by MSCA1 and is impaired by immune cells ». Les biopsies appariées de TA sous-cutané abdominal et viscéral ont été obtenues à partir de patients obèses morbides dont la cohorte est décrite dans le tableau supplémentaire 2 de l'article précédent « Human white and brite adipogenesis is supported by MSCA1 and is impaired by immune cells ».

Extraction des ARNm de tissu adipeux entier sous-cutané abdominal

Les biopsies de TA sous-cutané ont été congelés à -80°C immédiatement après réception des dermolipectomies abdominales. Les TA ont été lysés dans 5 volumes de Qiazol (Qiagen) à l'aide d'un ultra-turrax. Après l'ajout de 0.4 volume de chloroforme et centrifugation 15 minutes 3200 g à 4°C, la phase aqueuse a été récupérée. L'extraction des ARN a été réalisée à l'aide du kit RNeasy (Qiagen) selon les instructions du fabricant. Les concentrations des ARN ont été déterminées par la technologie Xpose (Trinean). La reverse transcription a été effectuée avec le kit Superscript II (Invitrogen) et la réaction d'amplification réalisée sur 15 ng d'ADN complémentaires, système de détection et logiciel d'analyse Viia 7 (Applied Biosystems). Les résultats ont été normalisés par les niveaux de l'ARN ribosomique 18S.

Analyses de cytométrie de flux

Après deux jours de traitement par BMP2 ou BMP4 (Peprotech, 50ng/ml), les cellules progénitrices ont été trypsinées et incubées avec les anticorps monoclonaux anti-humains couplés à un fluorochrome (dilution 1/20, 30 minutes, 4°C) (CD45 V500, CD34 PerCP et CD31 V450, BD Biosciences; MSCA1 PE et CD271 APC, Miltenyi Biotec) ou leurs isotypes respectifs. Après lavage, les cellules ont été analysées par cytométrie de flux en utilisant le cytomètre FACS CantoTM II et le logiciel Diva Pro (BD Biosciences).

Evaluation de la cytotoxicité par ToxiLight

Les surnageants des cellules contrôles, stimulées par BMP2 et BMP4, non-traitées et traitées avec les inhibiteurs SB203580 (Alexis Biochemicals) et PD98059 (Calbiochem) ont été prélevés après les deux jours de traitement. La cytotoxicité induite par ces différentes molécules a été évaluée à l'aide du kit ToxiLight (Lonza) selon les instructions du fabricant. Le surnageant a été incubé avec le réactif AKDR (adenylate kinase detection reagent) pendant 5 minutes à température ambiante puis les valeurs de bioluminescence ont été déterminées. Plus les cellules sont endommagées, plus elles libèrent l'adenylate kinase dans le milieu et plus les valeurs de bioluminescence sont élevées.

Références des sondes TaqMan (Applied Biosystems) :

BMP2 : Hs00154192_m1 ; BMP4 : Hs00370078_m1 ; Chordin : Hs00415315_m1 ; Noggin : Hs00271352_s1 ; Follistatin : Hs00246260_m1 ; Twisted Gastrulation (TWG1) : Hs00221028_m1.

Pour les autres gènes, voir le tableau supplémentaire 3 de l'article précédent « Human white and brite adipogenesis is supported by MSCA1 and is impaired by immune cells ».

Pour toutes les autres expériences, voir la section « matériels et méthodes » de l'article précédent « Human white and brite adipogenesis is supported by MSCA1 and is impaired by immune cells ».

Résultats et discussion

BMP2 et BMP4 sont pro-adipogéniques et stimulent spécifiquement la différenciation blanche.

Les effets des BMP2 et BMP4 sur l'adipogenèse des cellules progénitrices isolées du TA sous-cutané abdominal (voir la méthode de sélection dans la section « matériel et méthode » des publications 1 et 2) ont été étudiés en cultivant les cellules pendant deux jours en milieu contenant 10% de sérum de vœu foetal supplémenté ou pas (contrôle) en BMP2 ou BMP4

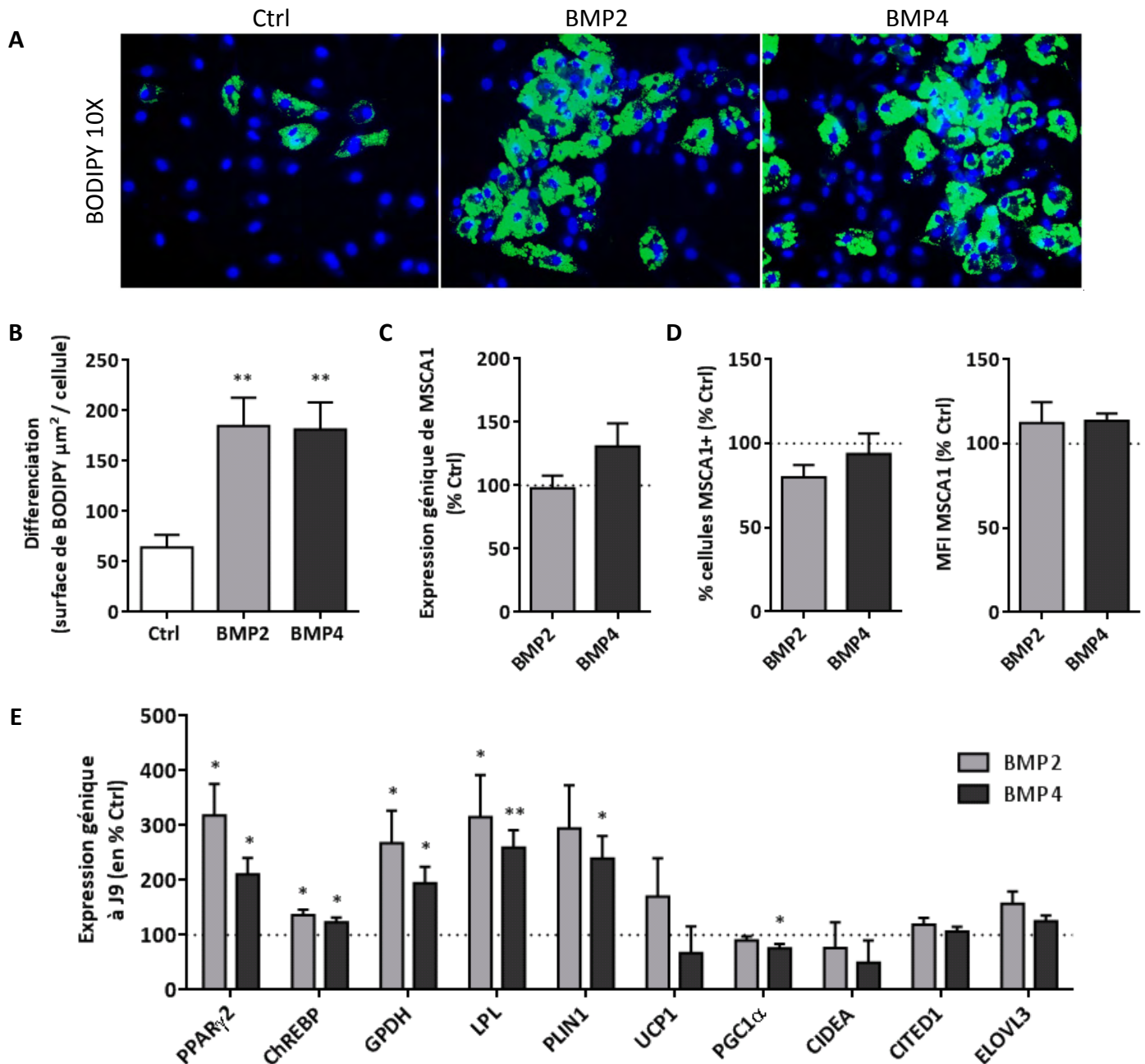


Figure 23 : BMP2 et BMP4 stimulent spécifiquement la différenciation blanche des cellules progénitrices humaines

Les cellules progénitrices isolées du TA sous-cutané ont été traitées pendant 2 jours par BMP2 ou BMP4 (50ng/ml) puis mises en conditions adipogéniques (sans agoniste PPAR γ) pendant 9 jours.

A) Accumulation lipidique marquée au BODIPY au jour 9 dans les conditions indiquées (Ctrl : contrôle), microscopie à fluorescence (objectif 10X).

B) Quantification de l'accumulation lipidique au jour 9 dans les conditions indiquées (n=14, moyenne \pm SEM, one way ANOVA et test de comparaison multiple de Dunnett **p<0.01 versus contrôle).

C) Expression génique de MSCA1 après les deux jours de traitement par BMP2 ou BMP4. Les résultats sont exprimés en pourcentage des cellules contrôles (n=12).

D) Pourcentage de cellules MSCA1+ (gauche) et intensité de fluorescence moyenne (MFI) de MSCA1 (droite) après les deux jours de traitement par BMP2 ou BMP4, déterminés en cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en pourcentage des cellules contrôles (n=3).

E) Expression génique des marqueurs classiques de la différenciation (PPAR γ 2, ChREBP, GPDH, LPL, PLIN1) et de la différenciation bruite (UCP1, PGC1 α , CIDEA, CITED1, ELOVL3) après 9 jours en milieu adipogénique dans les conditions indiquées. Les résultats sont exprimés en pourcentage des cellules contrôles (n=6, t test versus contrôle, *p<0.05, **p<0.01).

(50ng/ml). Ce traitement précoce et court a été choisi pour étudier l'effet des BMPs lors de l'étape d'engagement adipocytaire. A la suite des deux jours de traitement, les cellules ont été cultivées en milieu adipogénique composé d'insuline, triiodothyronine, transferrine et cortisol pendant neuf jours. A l'issue du protocole d'adipogenèse, l'accumulation lipidique a été évaluée par quantification du BODIPY (marqueur fluorescent des lipides neutres). BMP2 et BMP4 augmentent l'accumulation lipidique d'un facteur 2.8 chacune par rapport aux cellules non-traitées (Figure 23A et 23B). Nous avons précédemment démontré que l'induction de l'expression de MSCA1 signe l'état préadipocytaire. Afin de déterminer si BMP2 et BMP4 sont capables d'induire l'engagement dans la voie adipocytaire comme décrit chez la souris, les expressions génique et protéique de MSCA1 ont été déterminées par RT-qPCR et cytométrie de flux dans les cellules progénitrices (issues d'individus normo-pondérés ou en surpoids) après les deux jours de traitement aux BMP2 ou BMP4. Aucune différence d'expression génique de MSCA1 n'est observée (Figure 23C). Le pourcentage de cellules MSCA1+ au sein des cellules progénitrices ainsi que l'intensité moyenne de fluorescence de MSCA1 ne sont pas modifiés après les deux jours de traitement par BMP2 ou BMP4 (Figure 23D). Ces résultats suggèrent que BMP2 et BMP4 ne jouent pas sur l'étape d'engagement mais uniquement sur celle de la différenciation adipocytaire. L'activité enzymatique de MSCA1 à la suite des deux jours de traitement par BMP2 et BMP4 n'a pas été mesurée, mais nous savons que certaines molécules comme l'interféron- γ modulent l'activité sans modifier l'expression de MSCA1 (article précédent). Des expériences complémentaires seraient nécessaires afin de conclure quant aux effets de BMP2 et BMP4 sur l'étape d'engagement. Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure que ces effets soient indépendants de MSCA1. Enfin, il serait intéressant d'étudier les effets de ces BMPs sur les trois sous-types de cellules progénitrices isolés. Si BMP2 et BMP4 agissent sur l'étape de différenciation, elles devraient avoir un effet uniquement sur les cellules déjà engagées MSCA1+. Nous avons ensuite caractérisé le type d'adipogenèse, blanche ou brune, induit par BMP2 et BMP4 sur les cellules progénitrices issues d'individus normo-pondérés ou en surpoids (IMC de 21.5 à 27.8 kg/m²). Pour cela, à la fin du protocole d'adipogenèse, les expressions géniques de marqueurs classiques tardifs de la différenciation adipocytaire (PPAR γ 2, ChREBP, GPDH, LPL, PLIN1) et de marqueurs bruns ou bruns (UCP1, PGC1 α , CIDEA,

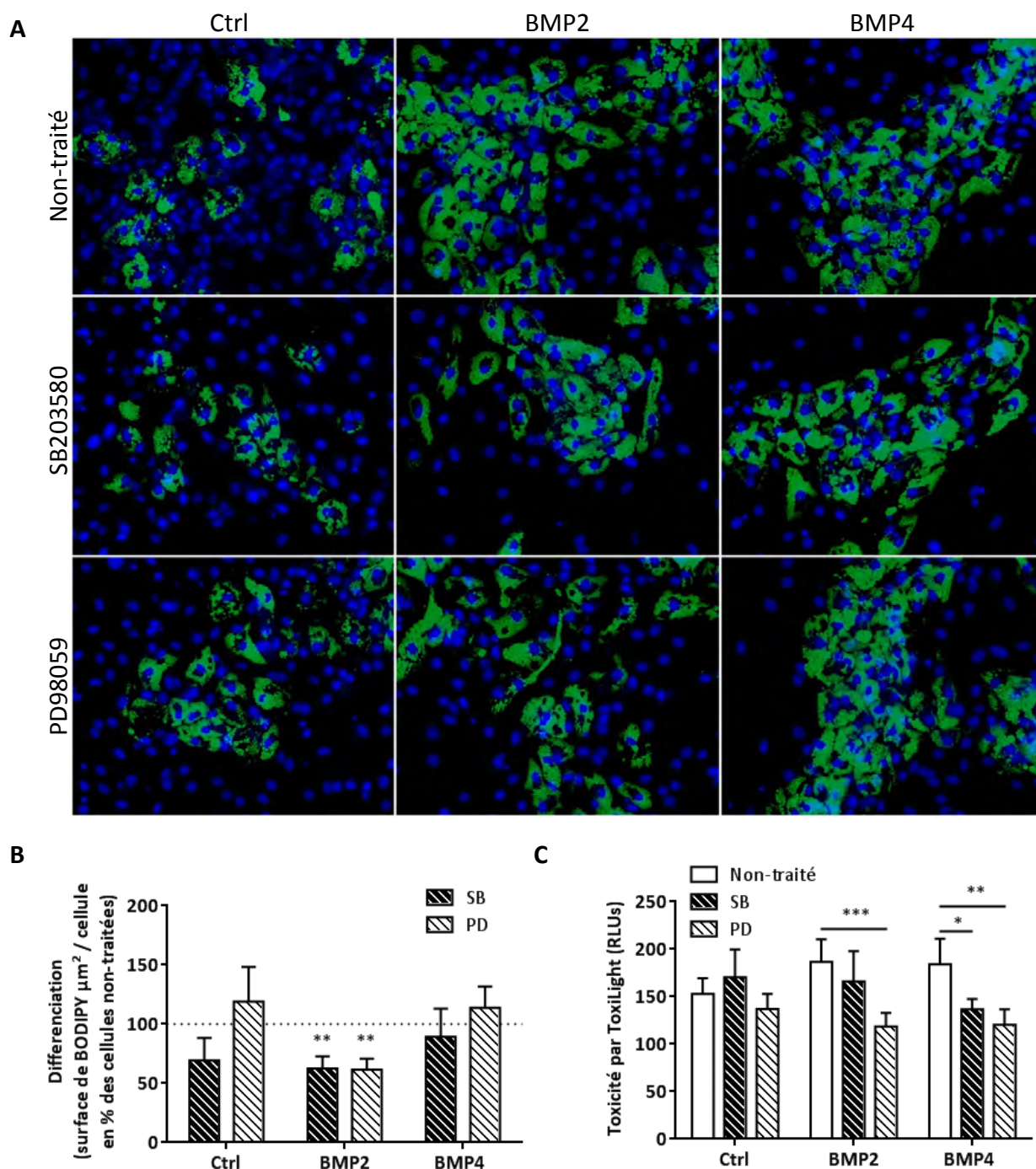


Figure 24 : Implication des protéines p38MAPK et ERK1/2 dans l'effet pro-adipogénique des BMP2 et BMP4

Les cellules progénitrices isolées ont été traitées pendant 2 jours par BMP2 ou BMP4 (50ng/ml) en présence d'inhibiteurs de p38MAPK (SB203580, 10μM) ou de ERK1/2 (PD98059, 10μM) ou sans inhibiteur (non-traité) puis mises en conditions adipogéniques pendant 9 jours.

A) Accumulation lipidique marquée au BODIPY au jour 9 dans les conditions indiquées (Ctrl : contrôle), microscopie à fluorescence (objectif 10X).

B) Quantification de l'accumulation lipidique dans les conditions indiquées. Les résultats sont exprimés en pourcentage des cellules non-traitées (n=5, t test versus non-traité **p<0.01).

C) Évaluation de la cytotoxicité induite par les inhibiteurs par ToxiLight (plus les valeurs de bioluminescence sont élevées plus les cellules sont endommagées) (n=4, moyenne ± SEM, two way ANOVA test de comparaisons multiples de Dunnett *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001). RLUs : relative luminescence units.

CITED1, ELOVL3) ont été étudiées. BMP2 et BMP4 augmentent l'expression des marqueurs tardifs classiques, confirmant leur effet pro-adipogénique blanc, mais ne modifient pas l'expression des marqueurs brites/bruns (Figure 23E). Les effets de BMP2 sur l'adipogenèse humaine ne sont pas connus, ceux de BMP4 sur l'adipogenèse brite sont controversés chez la souris (Tseng et al., 2008; Qian et al., 2013; Xue et al., 2014) et peu connus chez l'homme (Gustafson and Smith, 2012; Elsen et al., 2014). Les effets pro-adipogéniques de BMP4 sur les cellules de la FSV de TA humain sous-cutané ont été révélés après un traitement de 14 jours par BMP4 (50ng/ml), supplémenté les trois premiers jours avec un agoniste PPAR γ (Elsen et al., 2014). La différence de durée de traitement aux BMPs entre cette étude et la notre peut être à l'origine des divergences obtenues. Nos résultats suggèrent que BMP2 et BMP4 induisent spécifiquement la différenciation blanche des cellules progénitrices humaines et qu'elles sont sans effet sur la différenciation brite.

Voies de signalisation impliquées dans les effets pro-adipogéniques des BMP2 et BMP4.

Les BMPs sont connues pour activer les Smad1/5/8 et les MAP kinases p38MAPK et ERK1/2. Les activations de ces protéines induites par BMP2 et BMP4 dans les cellules progénitrices humaines devront être déterminées par western-blot. Afin de connaître le rôle des kinases p38MAPK et ERK1/2, les cellules progénitrices ont été traitées par BMP2 ou BMP4, en présence de l'inhibiteur SB203580 (inhibiteur de p38MAPK, 10 μ M) ou PD98059 (inhibiteur de ERK1/2, 10 μ M) pendant deux jours, puis cultivées dans le milieu adipogénique décrit précédemment pendant neuf jours. L'accumulation lipidique a été quantifiée au jour 9. Les inhibitions de p38MAPK et de ERK1/2 entraînent une diminution de l'accumulation lipidique induite par BMP2 mais sont sans effet sur celle induite par BMP4 (Figure 24A et 24B). La non-toxicité de ces inhibiteurs a été vérifiée par ToxiLight (Figure 24C). Il n'existe pas d'inhibiteur pharmacologique des Smads permettant d'étudier leur implication dans les effets pro-adipogéniques des BMP2 et BMP4. Le rôle de p38MAPK est connu dans l'adipogenèse (Aouadi et al., 2007) mais aux vues des effets relativement faibles que nous avons obtenus avec les inhibiteurs de p38MAPK et de

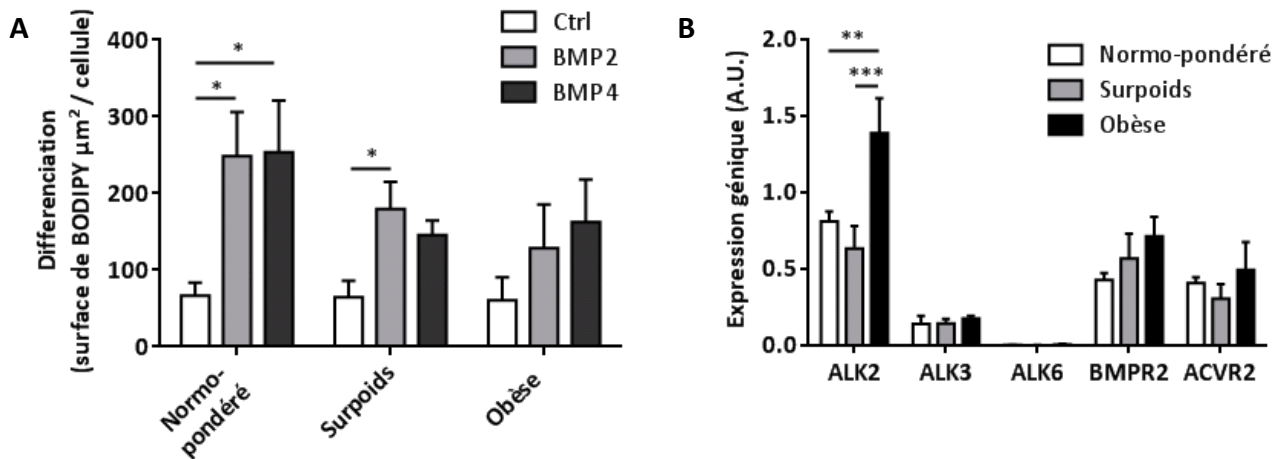


Figure 25 : Effets pro-adipogéniques des BMP2 et BMP4 selon l'indice de masse corporelle

- A) Les cellules progénitrices ont été isolées de TA sous-cutané abdominal provenant d'individus normo-pondérés ($\text{IMC} < 25$, $n=4$), en surpoids ($25 < \text{IMC} < 30$, $n=6$), ou obèse ($\text{IMC} > 30$, $n=4$), traitées pendant 2 jours aux BMP2 ou BMP4 (50ng/ml) puis mises en conditions adipogéniques pendant 9 jours. Quantification de l'accumulation lipidique au jour 9 dans les conditions indiquées en fonction de l'IMC, moyenne \pm SEM, two way ANOVA et test de comparaisons multiples de Dunnett * $p < 0.05$.
- B) Expression génique des récepteurs aux BMPs en fonction de l'IMC par les cellules progénitrices natives, isolées d'individus normo-pondérés ($\text{IMC} < 25$, $n=3-6$), en surpoids ($25 < \text{IMC} < 30$, $n=4-6$), ou obèse ($\text{IMC} > 30$, $n=5$), moyenne \pm SEM, two way ANOVA et test de comparaisons multiples de Tukey ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

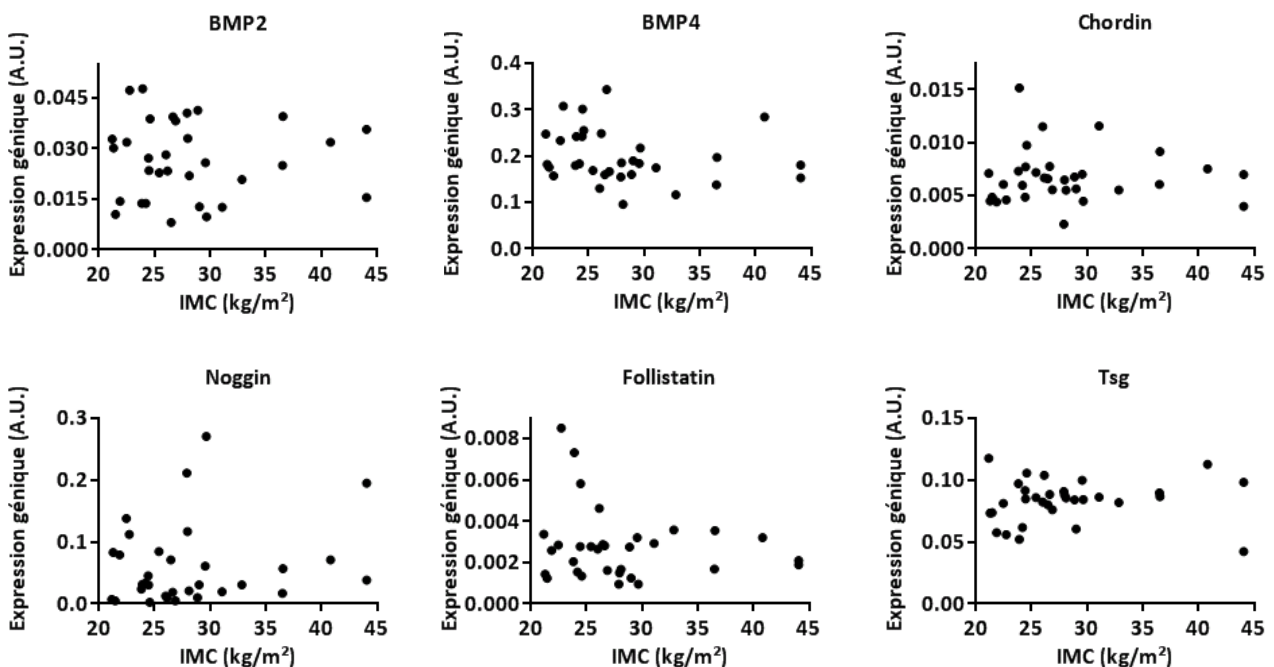


Figure 26 : Les expressions géniques des BMP2 et BMP4 et de leurs antagonistes dans le TA sous-cutané abdominal ne sont pas modulées en fonction de l'état d'obésité

Expression génique de BMP2, BMP4, Chordin, Noggin, Follistatin et Twisted Gastrulation (Tsg) dans le TA sous-cutané abdominal entier en fonction de l'indice de masse corporelle (IMC, en kg/m^2), $n=32$, test de corrélation Spearman, non significatif.

ERK1/2, la voie canonique des Smads constitue probablement la voie principalement impliquée dans l'adipogenèse induite par les BMP2 et BMP4.

L'effet pro-adipogénique des BMP2 et BMP4 est dépendant de l'état d'obésité.

Nous avons ensuite dichotomisé les effets des BMP2 et BMP4 selon l'IMC des individus dont les cellules progénitrices ont été isolées. L'effet pro-adipogénique des BMP2 et BMP4 est supérieur sur les cellules progénitrices issues d'individus normo-pondérés par rapport à celles provenant d'individus en surpoids, et est pratiquement perdu sur les cellules provenant d'individus obèses (Figure 25A). La diminution du potentiel adipogénique avec l'IMC n'est pas retrouvée en condition rosiglitazone (données non montrées). Cet effet pro-adipogénique dépendant de l'IMC ne s'explique pas par une diminution d'expression des récepteurs aux BMPs par les cellules progénitrices avec l'obésité (Figure 25B). L'expression de ALK2 est même plus élevée dans les cellules progénitrices provenant d'individus obèses par rapport à celles d'individus normo-pondérés ou en surpoids (Figure 25B). Concernant le récepteur de type I, il est décrit que BMP2 et BMP4 se lient préférentiellement au récepteur ALK3 puis au récepteur ALK2 (Lavery et al., 2008). La modification du ratio ALK3/ALK2 pourrait influencer les effets des BMP2 et BMP4 avec l'obésité. Au sein de la population de cellules progénitrices, la proportion des trois sous-types varie avec l'obésité (augmentation des MSCA1+), cependant les trois sous-types expriment à des niveaux équivalents les récepteurs aux BMPs (article précédent). Un défaut de la voie de signalisation des BMPs pourrait également expliquer cette observation qui s'apparenterait à une « résistance aux BMPs » avec l'obésité.

Modulation des expressions de BMP2 et BMP4 avec l'obésité.

Afin d'étudier la relevance physiologique des BMP2 et BMP4 chez l'homme, ainsi que celle de quelques uns de leurs antagonistes, leur expression a été analysée dans le TA sous-cutané abdominal provenant d'individus ayant des indices de masse corporelle variés (IMC de 21 à 44 kg/m²). BMP2 et BMP4 sont exprimés dans le TA sous-cutané mais leur expression n'est pas modulée selon l'IMC (Figure 26), contrairement à la diminution d'expression de BMP4 décrite

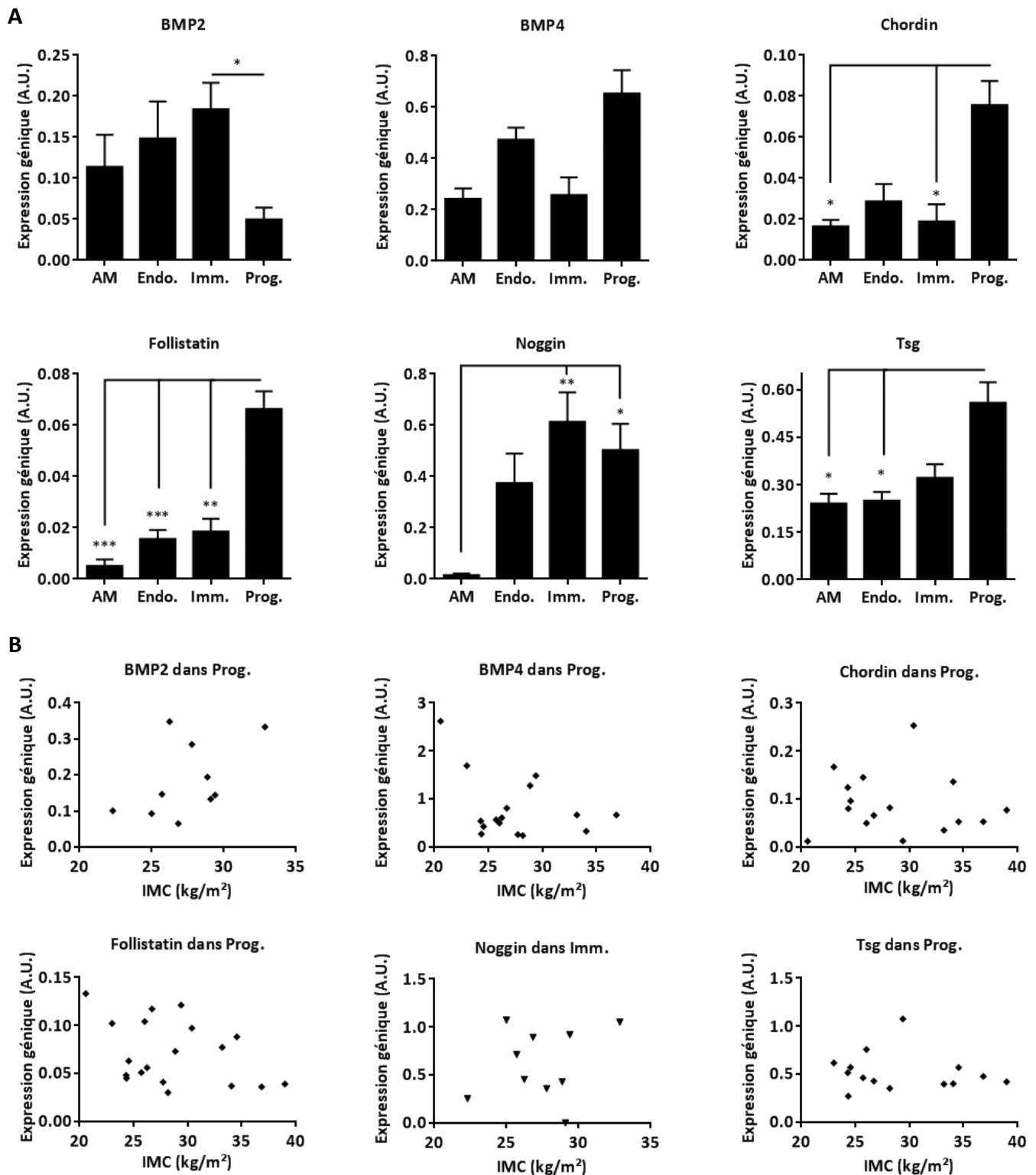


Figure 27 : Expressions géniques des BMP2 et BMP4 et de leurs antagonistes dans les populations cellulaires isolées du TA sous-cutané abdominal en fonction de l'état d'obésité

- A) Expressions géniques de BMP2, BMP4, Chordin, Noggin, Follistatin et Twisted Gastrulation (Tsg) dans les différentes populations cellulaires natives isolées du TA sous-cutané abdominal. Moyenne \pm SEM. One way ANOVA et post-test Bonferroni, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.
- B) Expressions géniques de BMP2, BMP4, Chordin, Noggin, Follistatin et Tsg dans les populations cellulaires natives indiquées, isolées du TA sous-cutané abdominal, en fonction de l'indice de masse corporelle (IMC, en kg/m^2). Test de corrélation Spearman, non significatif.
- AM : adipocytes matures ($n=6$), Endo. : cellules endothéliales ($n=6$), Imm. : cellules immunes (macrophages et lymphocytes) ($n=6-10$), Prog. : cellules progénitrices ($n=6-19$).

dans les TA sous-cutané et viscéral humain avec l'obésité (Qian et al., 2013). Les antagonistes Chordin, Noggin, Follistatin et Tsg (Twisted Gastrulation) sont également exprimés dans le TA sous-cutané, mais leur niveau d'expression ne semble pas modulé par l'état d'obésité (Figure 26).

Afin de déterminer avec plus de précisions les expressions des BMP2 et BMP4 et de leurs antagonistes, nous avons évalué leurs niveaux dans les différentes populations cellulaires natives, isolées du TA sous-cutané abdominal (adipocytes matures, cellules endothéliales, cellules immunes (macrophages et lymphocytes) et cellules progénitrices). Bien qu'aucun de ces facteurs ne semble exprimé spécifiquement par un type cellulaire, les cellules progénitrices présentent des niveaux d'expression plus importants de BMP4 et des antagonistes Chordin, Follistatin et Twisted gastrulation (Tsg) que les autres types cellulaires (Figure 27A). Aucune différence de niveau d'expression de ces facteurs n'a été observée dans les trois sous-types de cellules progénitrices (données non montrées). BMP2 et Noggin semblent plus exprimés par les cellules immunes. Les adipocytes matures expriment très faiblement ces facteurs (Figure 27A). L'expression de ces molécules a été analysée en fonction de l'IMC dans la population cellulaire qui les exprime majoritairement. Aucune modulation en fonction de l'IMC n'est observée (Figure 27B).

Modulation des expressions de BMP2 et BMP4 selon l'insulino-résistance.

Enfin, l'influence de la localisation tissulaire sur les expressions de BMP2 et BMP4 a été étudiée à partir de biopsies appariées de TA sous-cutané abdominal et viscéral (omental) provenant d'individus obèses morbides. Du fait de la faible quantité de tissus disponible qui limite l'isolement des différentes populations cellulaires de la FSV et de la faible expression des BMP2 et BMP4 dans les adipocytes matures, les expressions des BMP2 et BMP4 ont été déterminées dans les cellules de la FSV totale. BMP2 est davantage exprimée dans le TA viscéral que sous-cutané (Figure 28). Ce résultat n'est pas étonnant étant donné que BMP2 est exprimée par les cellules immunes et que la quantité de ces cellules est plus élevée dans le TA viscéral que sous-cutané chez l'obèse (Duffaut et al., 2009; O'Rourke et al., 2009). Les macrophages de la couche

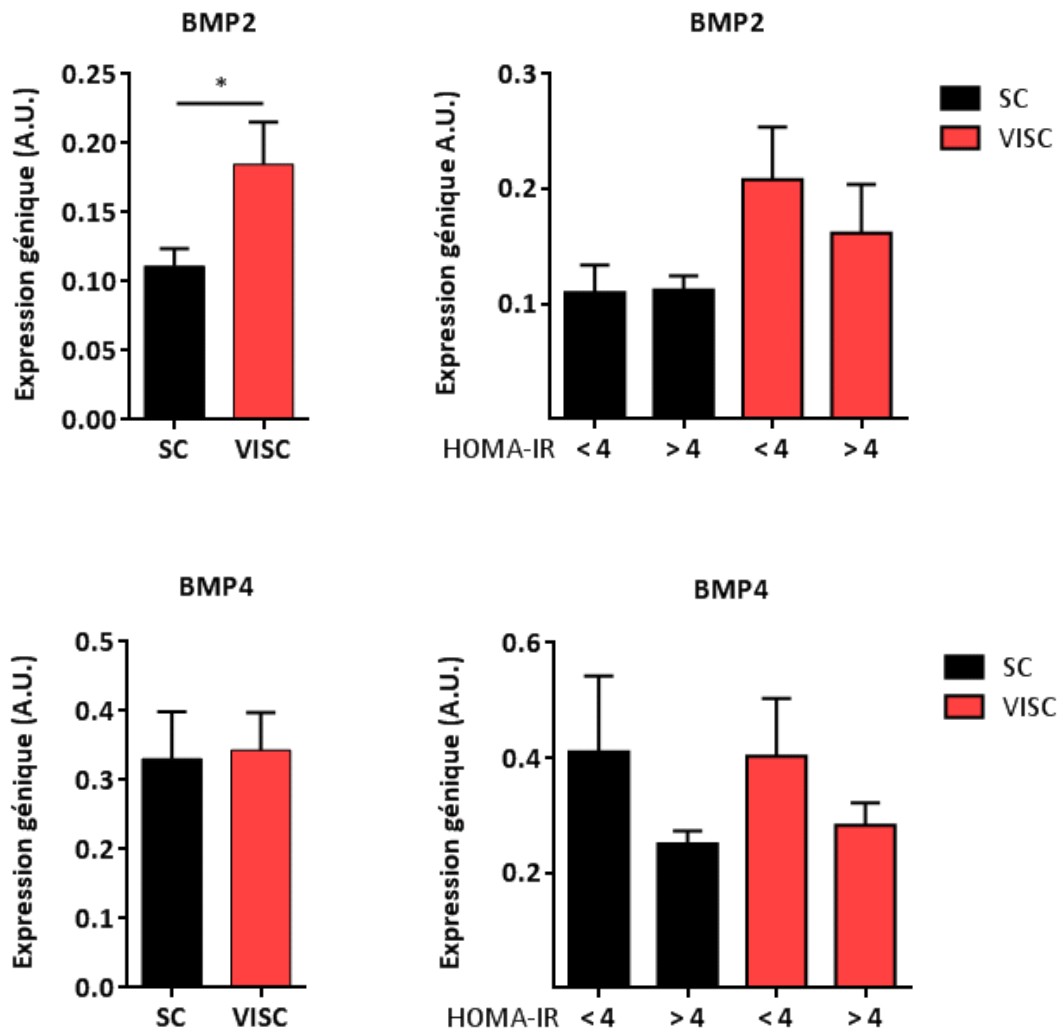


Figure 28 : Expression génique des BMP2 et BMP4 dans les cellules de la FSV de TA sous-cutané abdominal et viscéral en fonction de l'indice d'insulino-résistance

Expression génique de BMP2 et BMP4 dans les cellules de la FSV natives, isolées de TA sous-cutané abdominal (SC) et viscéral (VISC) appariés d'individus obèses (gauche) (n=10, moyenne \pm SEM. T test, * p<0.05) et selon l'indice d'insulino-résistance (HOMA-IR < 4, n=5 ; HOMA-IR > 4, n=5) (droite) (t test par localisation selon le HOMA-IR, non significatif).

musculaire externe de l'intestin expriment BMP2 (Muller et al., 2014). Il serait intéressant de déterminer si elle est également exprimée par les macrophages du TA, ou par les lymphocytes. BMP4 est exprimée de manière similaire dans les deux localisations (Figure 28). Les expressions de BMP2 et BMP4 dans les deux localisations ne sont pas modulées selon l'indice d'insulino-résistance (HOMA-IR) des individus (Figure 28).

En résumé, BMP2 et BMP4 augmentent la différenciation blanche des cellules progénitrices humaines, indépendamment de MSCA1, et sont sans effet sur la différenciation brune. Cependant, ces deux BMPs et quatre de leurs antagonistes ne sont pas exprimés spécifiquement par un type cellulaire du TA ni modulés par l'IMC. L'état de résistance à l'insuline ne semble pas non plus moduler les expressions des BMP2 et BMP4. Bien que l'expression protéique et la sécrétion de ces BMPs par les cellules du TA ne soient pas déterminées dans ce travail, nos résultats soulèvent la question de la relevance de leurs productions locales. Toutefois, il n'est pas exclu qu'elles soient produites dans d'autres organes et transportées jusqu'aux TA via la circulation sanguine. Ces deux protéines pourraient quand même être considérées comme des régulateurs endogènes potentiels de l'adipogenèse chez l'homme puisqu'elles sont retrouvées dans le sérum (Herrera and Inman, 2009; Albilal et al., 2013), et augmentée avec l'obésité pour BMP4 (Son et al., 2011).

Discussion-perspectives

Les TA blancs, par leur fonction de « tampon » des acides gras, diminuent le risque de formation de dépôts lipidiques ectopiques. Cependant, le développement des différentes localisations de TA blancs chez l'homme au cours de l'obésité ne sont pas associées aux mêmes risques de complications métaboliques. L'augmentation de la masse du TA viscéral est positivement corrélée au risque de développer des complications métaboliques et cardio-vasculaires (Bjorntorp, 1990; Masuzaki et al., 2001) et est considérée comme la plus délétère par rapport aux autres localisations (TA sous-cutané abdominal et glutéo-fémoral) (Abate et al., 1996; Ross et al., 1996; Manolopoulos et al., 2010). Le TA omental présente une accumulation de cellules immunes plus importante que le TA sous-cutané abdominal (Duffaut et al., 2009; O'Rourke et al., 2009). Au sein du TA sous-cutané abdominal, le compartiment profond est associé à la résistance à l'insuline et présente une accumulation de cellules immunes plus marquée que le TA superficiel (Kelley et al., 2000; Miyazaki et al., 2002; Tordjman et al., 2012). A côté de ces disparités cellulaires, les adipocytes des diverses localisations anatomiques possèdent des activités métaboliques et sécrétoires différentes qui contribuent au risque associé à leurs dépôts adipeux. On peut se demander si ces différences sont intrinsèques ou extrinsèques aux adipocytes. D'une part, les propriétés distinctes des adipocytes pourraient être le reflet de leurs origines différentes et donc liées à leurs cellules progénitrices. D'autre part, il semble clair que le microenvironnement (matrice extracellulaire, composition cellulaire) diffère selon les localisations et influe sur les activités des adipocytes. Les capacités adipogéniques des cellules issues des TA sous-cutanés abdominaux, superficiel et profond, et viscéraux, omental et mésentérique, ne sont pas équivalentes et suggèrent que les cellules progénitrices ne sont pas identiques dans les différents dépôts adipeux. Cependant, ces données obtenues à partir de cellules de la fraction stroma-vasculaire (FSV) globale, englobent les cellules progénitrices mais aussi une partie du microenvironnement (cellules endothéliales et cellules immunes), et ne permettent pas de discriminer l'influence du microenvironnement des propriétés des cellules progénitrices elles-mêmes. De plus, l'adipogenèse *in vitro* est presque toujours réalisée en utilisant des agents pharmacologiques, tels que les agonistes PPAR γ dont les ligands endogènes

ne sont toujours pas identifiés. Enfin, les inducteurs endogènes, produits localement dans le TA, ne sont pas ou peu connus.

1) Les cellules progénitrices des différents dépôts adipeux sont-elles différentes ?

Afin de répondre à cette question, nous avons étudié les capacités adipogéniques des cellules de la FSV et des cellules progénitrices CD34+/CD31- isolées par tri immuno-magnétique, issues des TA sous-cutanés (SC) abdominaux superficiel et profond. Nous avons ainsi mis en évidence que les cellules progénitrices isolées des deux localisations possèdent les mêmes capacités adipogéniques *in vitro* alors que les cellules de la FSV du TA SC profond présentent des capacités adipogéniques plus limitées que celles du TA SC superficiel. Il convient de noter que le TA SC abdominal profond contient davantage de lymphocytes T CD4 que le TA superficiel, dont les effets anti-adipogéniques sont connus (Duffaut et al., 2009). Ces résultats soulignent l'importance d'isoler les cellules progénitrices afin d'évaluer spécifiquement leurs propriétés, et l'intérêt d'utiliser les cellules de la FSV pour déterminer l'influence du microenvironnement et se rapprocher des conditions physiologiques.

Nous avons ensuite isolé les cellules progénitrices CD34+/CD31- des TA SC abdominal et viscéral (omental). Malgré l'absence du microenvironnement, les cellules du TA omental possèdent des capacités adipogéniques moindres comparé aux cellules du TA SC. Cette divergence peut être due soit à de réelles différences des cellules progénitrices des deux localisations, soit à des cellules progénitrices hétérogènes, isolées des tissus à un instant donné, et qui se trouvent à des étapes différentes de l'adipogenèse. Cependant, nous ne disposons pas de marqueurs des différents états du processus adipogénique. En effet, les marqueurs murins identifiant les cellules au stade préadipocytaire, tels que Pref-1 (Sul, 2009) ou Zfp423 (Gupta et al., 2010), ne sont pas relevant chez l'homme. Leurs expressions ne sont pas modulées au cours de l'adipogenèse des cellules progénitrices humaines *in vitro*, suggérant qu'ils ne sont pas des marqueurs d'état (données du laboratoire). De plus, un facteur de transcription ne permet pas d'isoler les cellules. Enfin, les préadipocytes murins ont été caractérisés par leur absence d'expression de CD24 (Berry and Rodeheffer, 2013). L'identification de marqueurs de surface présents aux différents états du processus adipogénique apporterait de nouveaux outils afin de

mieux caractériser l'adipogenèse chez l'homme et permettrait de proposer de nouvelles stratégies pour améliorer la fonction des TA.

2) La population CD34+/CD31- contient-elle les cellules aux différents stades de l'adipogenèse ?

Afin d'identifier un marqueur de surface du stade préadipocytaire, nous avons étudié l'hétérogénéité de la population CD34+/CD31- par l'expression de deux marqueurs de surface, MSCA1 et CD271. De fait, la population de cellules progénitrices est composée de trois sous-types qui semblent être à différentes étapes de l'adipogenèse : les CD271+/MSCA1+, les CD271+/MSCA1- et les CD271-/MSCA1-. Un seul sous-type est positif pour MSCA1 et correspond aux cellules les plus engagées dans la voie adipocytaire blanche. Ce sous-type possède également des capacités de différenciation brite. Est-ce que ces cellules sont les préadipocytes au sens strict du terme, donc restreint au lignage adipocytaire, ou simplement les plus engagées par rapport aux autres sous-types ? Des expériences de différenciation de ces cellules dans d'autres lignages cellulaires, myofibroblastique ou endothélial par exemple, permettraient de répondre à cette question. Néanmoins, au sein des trois sous-types identifiés à l'heure actuelle, MSCA1 apparaît comme un marqueur associé au stade préadipocytaire. De plus, son expression ainsi que son activité phosphatase alcaline sont nécessaires au processus d'adipogenèse. Plusieurs questions demeurent concernant la caractérisation de MSCA1. Quels sont les facteurs endogènes qui régulent son activité ? Quels sont les substrats et les produits de cette enzyme impliqués dans l'adipogenèse et comment ses substrats agissent-ils ? Enfin, si l'adipogenèse est inhibée dans un dépôt adipeux, est-ce dû à un défaut de substrat, ou à la dégradation du produit ? Ces questions feront partie des investigations futures du laboratoire. Toutefois, le sous-type CD271+/MSCA1- semble être dans un état intermédiaire du processus adipogénique, entre les cellules MSCA1+ et le sous-type CD271-/MSCA1- qui semble être le plus immature. Il est à noter que l'engagement de ces deux sous-types conduit à l'émergence des cellules CD271+/MSCA1+. Cependant à ce jour, nous ne savons pas s'ils correspondent réellement à un continuum des différents états du processus d'adipogenèse ou si ces deux populations sont

distinctes. Par ailleurs, des données précédentes du laboratoire ont montré que les cellules progénitrices possèdent des capacités de différenciation endothéliale et myofibroblastique (Miranville et al., 2004; Bourlier et al., 2008; Bourlier et al., 2012). La question de savoir si ces deux potentiels de différenciation sont portés par l'un ou l'autre de ces sous-types reste posée. La caractérisation plus approfondie de leurs capacités de différenciation permettra de déterminer si l'un d'entre eux correspond aux vraies cellules « souches », non-engagées dans un lignage cellulaire et qui devraient garder leur multipotence. Enfin, il convient de garder à l'esprit que ces deux sous-types pourraient encore être hétérogènes et leur sous-division sera peut-être nécessaire pour identifier spécifiquement ces différentes populations cellulaires. A l'heure actuelle, nos travaux n'excluent pas que les sous-types CD271-/MSCA1- et CD271+/MSCA1- possèdent une origine développementale différente, bien que nous n'ayons pas mis en évidence de différences d'expression des gènes du développement HoxB2 et HoxC9 entre ces deux sous-types (données non montrées). Une étude en cours plus approfondie de l'expression d'autres gènes du développement maintenus chez l'adulte (dont les Hox à compléter) devrait permettre d'apporter des réponses (Gesta et al., 2006; Yamamoto et al., 2010; Sagi et al., 2012). De plus, l'origine développementale des trois sous-types au sein des différents dépôts adipeux pourrait être différente. Dans ce cas, MSCA1 serait un marqueur d'état engagé, indépendamment de la localisation et peut-être du type cellulaire.

Dans le TA SC abdominal, nos travaux montrent que la quantité de préadipocytes MSCA1+ varie avec l'adiposité. En effet, chez l'obèse, la quantité de cellules MSCA1+ est plus élevée dans le TA SC abdominal que dans le TA omental. Si on considère que les complications métaboliques associées à l'obésité proviennent entre autre d'un déficit de stockage lipidique dans les TA, un défaut d'adipogenèse pourrait contribuer à limiter leurs capacités d'expansion. Ce défaut d'adipogenèse semble différemment modulé par l'obésité selon la localisation du TA. En effet, au sein du TA SC abdominal, l'étape de différenciation semble inhibée conduisant à l'accumulation des préadipocytes MSCA1+ alors que dans le TA omental, l'adipogenèse semble bloquée dès l'étape d'engagement, ce qui conduit à une plus faible quantité de préadipocytes dans ce tissu. Ainsi, le microenvironnement du TA est modifié selon l'indice de masse corporelle et la localisation anatomique et module la quantité des préadipocytes MSCA1+. En effet, via la

régulation de l'expression et de l'activité de MSCA1, les cellules immunes inhibent l'adipogenèse blanche et brite alors que BMP7 est un inducteur de l'adipogenèse.

3) Les BMP2, BMP4 et BMP7 sont-elles des régulateurs endogènes de l'adipogenèse humaine ?

Les inducteurs de l'adipogenèse produits localement dans le TA ne sont pas ou peu connus, la plupart des signaux identifiés à ce jour présentent des propriétés anti-adipogéniques (en particulier les sécrétions des cellules immunes). Les BMP2, BMP4 et BMP7 ont été impliquées dans l'engagement et la différenciation adipocytaire chez la souris *in vitro* et *in vivo* (Ahrens et al., 1993; Hata et al., 2003; Tang et al., 2004; Tseng et al., 2008; Huang et al., 2009). Cependant, l'origine des BMPs n'étant pas connue, sont-elles produites dans le TA murin et différemment selon la localisation ou avec l'obésité ? Leurs effets pro-adipogéniques chez l'homme sont parfois controversés et leur action sur l'étape d'engagement ou/et de différenciation n'est pas connue. L'identification de MSCA1 comme un marqueur du préadipocyte nous a permis de montrer que BMP7 induit bien l'engagement puisqu'elle augmente l'expression et l'activité enzymatique de MSCA1. Cette BMP promeut ainsi l'adipogenèse blanche mais également l'adipogenèse brite. En revanche, BMP2 et BMP4 induisent spécifiquement la différenciation blanche, indépendamment de MSCA1, et sont sans effet sur la différenciation brite. Pour confirmer leurs actions sur l'étape de différenciation, des expériences complémentaires de traitement aux BMP2 et BMP4 des trois sous-types de cellules progénitrices isolés semblent nécessaires. Si notre hypothèse est exacte, ces BMPs devraient induire la différenciation des cellules MSCA1+ déjà engagées et être sans effet sur les deux autres sous-types. La difficulté d'obtention des trois sous-types en quantité suffisante ne nous a pas permis de vérifier cette hypothèse jusqu'à maintenant. BMP2 et BMP4 sont bien des régulateurs de l'adipogenèse humaine mais ne semblent pas produites dans le TA. Peut-on alors les considérer comme des régulateurs endogènes ? Il faudrait déterminer si elles sont produites par un autre organe et parviennent jusqu'aux TA via la circulation sanguine. Il est à noter qu'elles ont été mesurées dans le sérum humain et la concentration de BMP4 augmente même avec l'obésité (Herrera and

Inman, 2009; Son et al., 2011; Albilal et al., 2013). Le ou les organe(s) producteur(s) de BMP4 ainsi que les signaux qui la régulent ne sont pas connus. En revanche, BMP7 apparait comme un régulateur endogène de l'adipogenèse humaine. Elle est produite dans le TA spécifiquement par le sous-type CD271-/MSCA1- et son expression augmente avec l'obésité. Les signaux qui régulent sa production dans le TA restent à être déterminés. Cette BMP est davantage exprimée par les cellules de la FSV issue de TA omental que sous-cutané abdominal. Une des grandes différences en termes de composition cellulaire entre ces deux localisations est la quantité de cellules immunes qui est supérieure dans le TA omental. Il serait intéressant d'évaluer les effets des sécrétions des lymphocytes et des macrophages sur l'expression de BMP7, mais aussi l'influence des sécrétions adipocytaires des deux localisations.

4) Mise en évidence d'un potentiel de différenciation brite des cellules progénitrices humaines

A ce jour, aucune étude ne démontre l'existence d'adipocytes brites *in vivo* dans le TA sous-cutané abdominal chez l'homme, en conditions normales ou en réponse au froid. Dans le contexte pathologique très particulier de la cachexie associée au cancer, la présence d'adipocytes UCP1 positifs dans plusieurs dépôts adipeux blancs internes (autour du rein, du cœur, du foie, du pancréas et de l'intestin) a été mise en évidence (Kir et al., 2014; Petruzzelli et al., 2014). Nous avons montré que les cellules progénitrices du TA sous-cutané abdominal possèdent des capacités de différenciation brite *in vitro*. Nos résultats suggèrent que les adipocytes blancs et brites humains possèdent un préadipocyte commun MSCA1+. L'étude de MSCA1 dans des localisations brites ou brunes chez l'homme, en position supra-claviculaire ou au niveau du cou, pourrait permettre de corroborer la relevance de ce marqueur dans la thématique brune/brite. La possibilité que la population MSCA1+ soit hétérogène n'est pas exclue, elle pourrait être elle-même composée de plusieurs sous-types dont l'un d'eux posséderait spécifiquement le potentiel brite. L'expression de BMP7 dans la localisation sous-cutanée abdominale renforce l'hypothèse selon laquelle il pourrait y avoir des adipocytes brites chez l'homme. Cependant, nous avons montré que les cellules immunes et leurs sécrétions

inhibent la différenciation brite des cellules progénitrices, suggérant que la présence des adipocytes brites dans le TA sous-cutané devra être étudiée chez des sujets normo-pondérés. Enfin, les données montrent que la quantité de TA brun (ou brite) chez l'homme dans les localisations cervicales et supra-claviculaires diminue avec l'obésité (Cypess et al., 2009). On peut se demander si cette disparition provient d'une balance énergétique positive, d'une diminution de l'activité du système nerveux sympathique, ou de l'inflammation chronique de bas bruit. La possibilité de réinduction de ce TA ou des stratégies visant à augmenter les adipocytes brites dans les TA blancs restent à être démontrées.

5) Quelles stratégies adopter pour éviter le développement des pathologies associées à l'obésité ?

Les points abordés précédemment permettent de proposer plusieurs stratégies pour diminuer le risque de développer des pathologies associées à l'obésité.

1 : Limiter le développement des TA par résection chirurgicale.

La résection chirurgicale du TA omental seul chez l'homme obèse n'améliore pas la sensibilité à l'insuline (Fabbrini et al., 2010; Lima et al., 2013). D'autre part, la dénervation chimique du système nerveux sympathique au niveau du TA omental chez le chien entraîne une augmentation de la masse de ce TA après 15 jours, sans modifier les autres dépôts. Ce phénotype n'est pas associé avec une altération de la sensibilité à l'insuline, montrant que dans ce modèle, avec les nombreuses limites qu'il possède, le TA omental n'est pas délétère en terme de sensibilité à l'insuline (Castro et al., 2014). La diminution des TA SC abdominaux superficiel et profond de 50% par liposuction n'améliore pas les paramètres métaboliques tels que la sensibilité à l'insuline (Klein et al., 2004). En revanche, la diminution de la masse des TA SC (abdominal et glutéo-fémoral) et des TA viscéraux, par réduction des apports caloriques et augmentation de l'activité physique (Dattilo and Kris-Etherton, 1992; Stevens et al., 2001; Ziccardi et al., 2002; Uusitupa et al., 2003) ou suite à une chirurgie bariatrique (Busetto et al.,

2000; Sjostrom et al., 2004; Holdstock et al., 2005; Poitou et al., 2006; Buchwald et al., 2009; Heath et al., 2009; Galanakis et al., 2014), améliore les paramètres métaboliques (sensibilité à l'insuline, diminution des marqueurs de l'inflammation et des facteurs de risque cardiovasculaires). A nouveau, la diminution du TA SC abdominal superficiel et/ou profond n'a pas été déterminée à la suite de ces pertes de poids et il serait intéressant de préciser si l'un ou l'autre de ces tissus est préférentiellement impacté. Quoi qu'il en soit, la perte de poids par régime est difficile à maintenir dans le temps et la chirurgie bariatrique est une technique à risque réservée aux obèses morbides.

2 : Stimuler l'utilisation des lipides par le muscle ou les adipocytes brites.

La façon la plus simple d'utiliser les lipides reste l'exercice physique. Une autre stratégie peut être envisagée, l'activation du TA brun ou la promotion du « browning » des TA blancs. Chez l'homme, la quantité et l'activité du TA brun sont relativement faibles et diminuent avec l'âge et l'obésité (Cypess et al., 2009). Chez la souris, l'activation du TA brun (Cannon and Nedergaard, 2004) comme la présence d'adipocytes brites (Bartelt and Heeren, 2014) dans le TA inguinal permettent d'augmenter la dépense énergétique et d'améliorer les paramètres métaboliques. Plusieurs facteurs sont connus pour induire le « browning » ainsi que pour activer le TA brun : l'exposition au froid, l'activation du système nerveux sympathique via des agonistes β_3 adrénergiques, des molécules comme les peptides natriurétiques, le FGF21, BMP8b, BMP7, l'irisine ou les agonistes PPAR γ (Tseng et al., 2008; Petrovic et al., 2010; Bordicchia et al., 2012; Bostrom et al., 2012; Fisher et al., 2012; Ohno et al., 2012; Whittle et al., 2012). La relevance de l'irisine et des récepteurs β_3 adrénergiques chez l'homme est fortement controversée (Tavernier et al., 1996; Carpene et al., 1999; Raschke et al., 2013; Elsen et al., 2014). En revanche, l'exposition au froid régulière, les BMP7 et BMP8b, comme les peptides natriurétiques, pourraient être envisagés pour augmenter l'efficacité du TA brun et induire l'apparition d'adipocytes brites chez l'homme dans le TA SC mais aussi les TA viscéraux (Tseng et al., 2010; Nedergaard and Cannon, 2012; Chechi et al., 2013). Les thiazolidinediones (agonistes de PPAR γ) améliorent les paramètres métaboliques de patients diabétiques, malgré une prise de poids (Kelly et al., 1999; Mori et al., 1999; Miyazaki et al., 2002; Koenen et al., 2009; McLaughlin et al., 2012). On peut se demander si leur effet bénéfique ne passerait pas en partie

via une induction du « browning » chez l'homme. Enfin, la perte de poids engendrée par la chirurgie bariatrique induit une augmentation de l'activité du TA brun chez l'homme (Vijgen et al., 2012). Une diminution de l'isolation thermique par le TA pourrait expliquer en partie ce phénomène mais les mécanismes impliqués restent à être déterminés.

3 : Promouvoir l'adipogenèse.

La notion de « l'obésité en bonne santé » est largement débattue, mais si on considère uniquement le versant métabolique, 10 à 30% des individus obèses ne seraient pas malades (Bluher and Schwarz, 2014; Lavie et al., 2014). Chez la souris, la surexpression de la protéine mitochondriale MitoNEET entraîne une obésité massive qui n'est pas associée à une altération de la sensibilité à l'insuline (Kusminski et al., 2012). Promouvoir l'adipogenèse pourrait restaurer la fonction « tampon » des TA en augmentant leurs capacités de stockage et éviter l'accumulation lipidique dans le muscle, le foie ou le pancréas. Cependant, faudrait-il cibler certains TA ? Est-ce que tous les TA sont de « vrais » TA ? Ont-ils des fonctions biologiques différentes ? Est-ce que certains TA apparaissent avec l'obésité et pourraient être considérés comme des dépôts adipeux « ectopiques » ? Les TA SC abdominal superficiel et glutéo-fémoral sont présents chez les individus normo-pondérés, comme les TA omental et mésentérique. En revanche, le TA SC abdominal profond ne semble pas être présent chez les individus normo-pondérés (d'après nos observations des dermolipectomies abdominales reçues au laboratoire), suggérant que ce TA apparait quand le TA SC superficiel a atteint ses capacités de stockage maximales. En fait, la présence des autres TA viscéraux (autour du rein, du cœur, du foie...) n'est pas clairement décrite chez les individus normo-pondérés et l'évaluation de la distribution de la masse grasse prend généralement en compte le TA SC et le TA viscéral dans leur globalité, sans distinguer les différents dépôts adipeux. De plus, bien qu'il semble que tous les TA augmentent avec l'obésité, on ne sait toujours pas si leur capacité de « nuisance métabolique » est identique. Sont-ils tous délétères ? Promouvoir l'adipogenèse dans les TA SC abdominal superficiel et glutéo-fémoral ainsi que omental pourrait être bénéfique. Les thiazolidinediones induisent une augmentation du TA SC abdominal par hypertrophie et hyperplasie adipocytaire (Kelly et al., 1999; Mori et al., 1999; Miyazaki et al., 2002; Koenen et al., 2009; McLaughlin et al., 2012). Cependant, les dépôts SC profond et superficiel n'ont pas été étudiés. Il serait intéressant

de réévaluer les effets de ces molécules pour savoir si elles agissent plus particulièrement sur le TA SC superficiel que sur le TA SC profond. Nos données montrent que chez l'obèse, le TA SC abdominal global présente une accumulation de cellules MSCA1+. Afin de promouvoir l'adipogenèse dans ce territoire, l'utilisation des BMP2 et BMP4 pourrait s'avérer utile puisqu'elles augmentent la différenciation sans jouer sur l'engagement. Si la « résistance » à ces BMPs avec l'obésité se confirme, des stratégies pour améliorer leur signalisation via des agonistes ou l'inhibition de leurs antagonistes pourrait être plus relevant. En revanche, le TA omental chez l'obèse contient peu de cellules MSCA1+. Dans ce cas, il faudrait stimuler à la fois l'engagement et la différenciation adipocytaire, via la sphère de BMP7 par exemple. Cette BMP a déjà été évaluée chez l'homme dans le cadre de fracture osseuse et semble améliorer la vitesse de réparation et l'épaisseur de l'os, montrant qu'elle est administrable à l'homme en terme de sécurité (Bishop and Einhorn, 2007). La compagnie pharmaceutique Mariel Therapeutics est dédiée au développement d'applications utilisant BMP7 dans le cadre de l'ostéoarthrite et de la fibrose rénale, alors pourquoi pas dans le cadre de l'obésité. Etant donné les effets pro-ostéogéniques et pro-adipogéniques de BMP7 à des concentrations élevées et faibles respectivement *in vitro* (Wang et al., 1993; Chen et al., 2001), on pourrait suggérer que l'utilisation de faibles concentrations de BMP7 ciblerait son action sur le TA. Néanmoins, les effets métaboliques des BMP2, BMP4 et BMP7 sur les adipocytes matures humains ne sont pas connus et devront être déterminés en termes de lipolyse et de lipogenèse.

Lever l'inhibition de l'adipogenèse exercée par les cellules immunes semble également une stratégie d'intérêt. Le lien associant les cellules immunes aux dysfonctions métaboliques, « l'immuno-métabolisme », est maintenant bien établi (Mathis and Shoelson, 2011; Tanti et al., 2013). De nombreuses stratégies anti-inflammatoires sont envisagées pour améliorer les complications associées à l'obésité (Donath, 2014). Parmi elles, un antagoniste du récepteur à l'interleukine-1, l'anakinra, améliore la sensibilité à l'insuline ainsi que la fonction des cellules β pancréatiques de patients atteints de diabète de type 2 (Larsen et al., 2007). De plus, les cellules immunes sont impliquées dans la mise en place de la fibrose dans le TA avec l'obésité. L'établissement de cette fibrose entraîne des contraintes physiques, des dysfonctions des adipocytes et limite l'expansion de ces dépôts (Divoux et al., 2010; Sun et al., 2013). La fibrose

se caractérise par un remodelage de la matrice extracellulaire associé à une synthèse importante de différents types de collagènes, et se développe en réponse à une augmentation des signaux hypoxiques et à une accumulation des macrophages avec l'obésité. Le TGF- β est un acteur important de la mise en place de la fibrose (Wynn, 2008). Sa production par les macrophages du TA augmente avec l'obésité et il promeut la différenciation des cellules progénitrices humaines en myofibroblastes, cellules sécrétrices de la matrice extracellulaire (Bourlier et al., 2012). Ce remodelage du tissu semble être une réponse adaptative physiologique qui devient pathologique lorsqu'elle devient excessive. De fait, plus la fibrose est importante, plus la perte de poids en réponse à une chirurgie de l'obésité est faible (Divoux et al., 2010). Empêcher le développement excessif de la fibrose pourrait donc être bénéfique. Les effets de BMP2 sur la fibrose sont controversés alors que BMP4 semble plutôt pro-fibrotique. D'une part, BMP2 prévient la fibrose induite par le TGF- β dans les cellules stellaires pancréatiques humaines et murines (Gao et al., 2013) et dans une lignée de fibroblastes rénaux de rat ainsi que *in vivo* (Yang et al., 2009). D'autre part, elle stimule la différenciation myofibroblastique de progéniteurs du rein (Simone et al., 2012) et augmente l'expression du marqueur myofibroblastique α SMA dans les cellules épithéliales des voies respiratoires, tout comme BMP4 (McCormack et al., 2013). BMP4 stimule l'hypertrophie et la fibrose cardiaque chez la souris (Sun et al., 2012). Les effets pro- ou anti-fibrotiques de ces deux BMPs sont observés à la suite de traitements à des concentrations similaires, et pourraient donc être tissu-spécifique. Aucune donnée n'est disponible concernant leur rôle dans le TA humain. Néanmoins, l'utilisation de ces BMPs dans le but de promouvoir l'adipogenèse et d'améliorer la fonction des TA ne semble pas être une bonne stratégie compte tenu de leurs effets potentiellement pro-fibrotiques sur d'autres organes. Enfin, la littérature indique que BMP7 possède des effets anti-fibrotiques dans plusieurs organes (Weiskirchen et al., 2009). Dans le rein, elle prévient et réverse la transition épithelio-mésenchymateuse induite par le TGF- β , diminue l'expression de certaines formes de collagènes et la fibrose, et permet d'améliorer la fonction rénale dans des modèles murins de néphropathie diabétique (Zeisberg et al., 2003; Zeisberg et al., 2003; Sugimoto et al., 2007). BMP7 inhibe également le développement de la

fibrose dans le foie et dans le cœur (Kinoshita et al., 2007; Zeisberg et al., 2007; Zhong et al., 2013). Les effets de BMP7 sur la fibrose dans le TA ne sont pas connus et devront être étudiés.

Des schémas bilan et de perspectives sont proposés en figures 29 et 30.

En conclusion, BMP7 apparait comme une cible thérapeutique particulièrement intéressante pour lutter contre l'obésité en régulant le métabolisme énergétique via ses effets anorexigènes et stimulateurs de la dépense énergétique, mais aussi pour limiter le développement des pathologies associées à l'obésité. En effet, elle pourrait également permettre d'améliorer l'expansion du TA par ses effets anti-fibrotiques et pro-adipogéniques, et pourquoi pas via la promotion de l'apparition d'adipocytes brites chez l'homme.

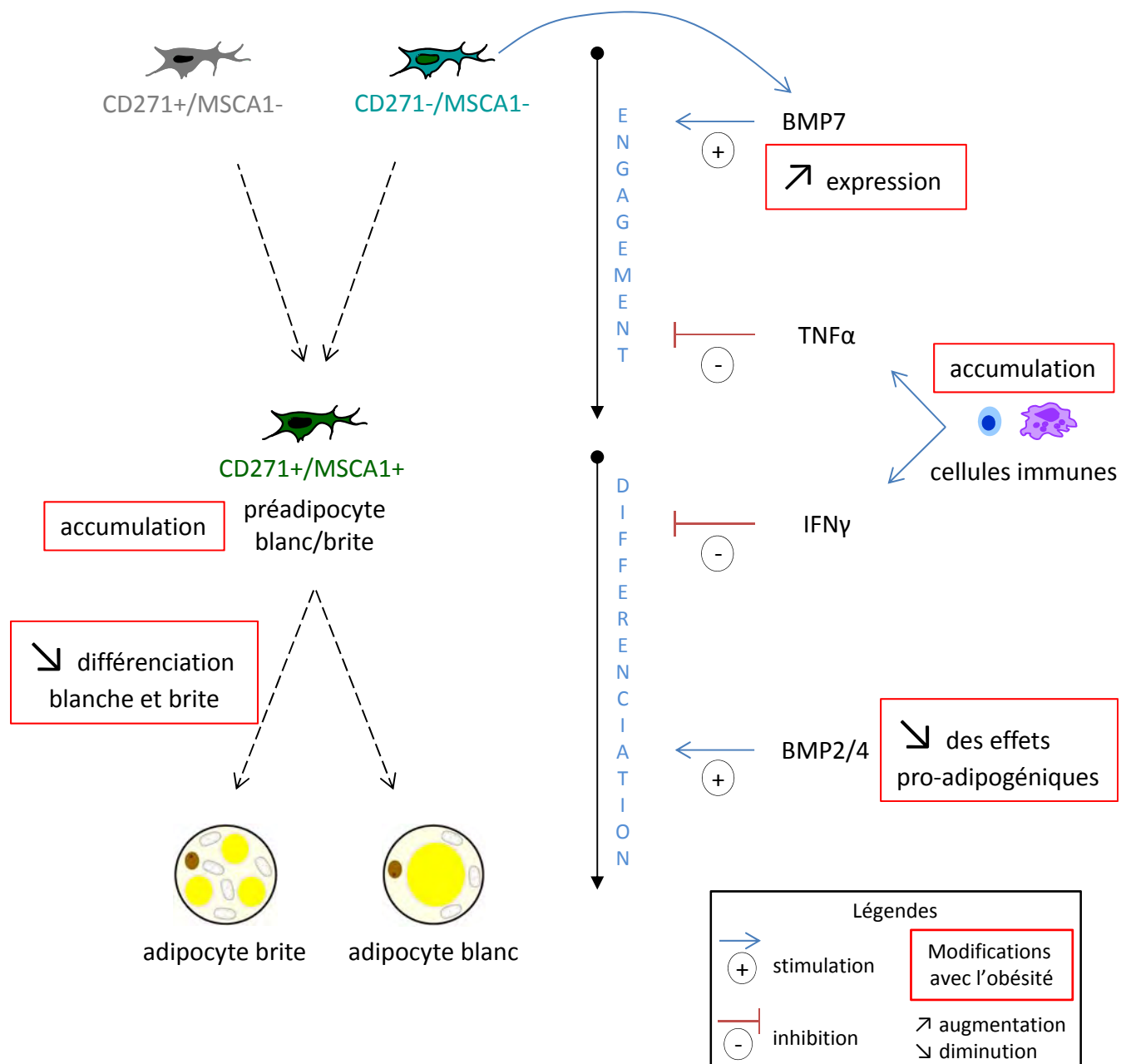


Figure 29 : Bilan

L'engagement des sous-types CD271-/MSCA1- et CD271+/MSCA1- dans la voie adipocytaire conduit à l'émergence des préadipocytes CD271+/MSCA1+. BMP7 est produite par les cellules CD271-/MSCA1- et stimule l'engagement. Les préadipocytes CD271+/MSCA1+ possèdent un double potentiel de différenciation adipocytaire blanche et brite. BMP2 et BMP4 stimulent uniquement la différenciation adipocytaire blanche.

Dans le TA sous-cutané abdominal, une augmentation de l'expression de BMP7, une diminution des effets pro-adipogéniques des BMP2 et BMP4 et une accumulation des cellules immunes, dont les sécrétions inhibent l'engagement et la différenciation blanche et brite, sont observées avec l'obésité. Les modifications du microenvironnement conduisent à une inhibition de la différenciation adipocytaire blanche et brite et à une accumulation des préadipocytes CD271+/MSCA1+.

Le TA viscéral n'est pas représenté ici. Dans ce tissu, l'expression de BMP7 et l'accumulation des cellules immunes avec l'obésité sont encore plus élevées que dans le TA sous-cutané, conduisant à une inhibition de l'adipogenèse dès l'étape de l'engagement et à une faible quantité de préadipocytes CD271+/MSCA1+.

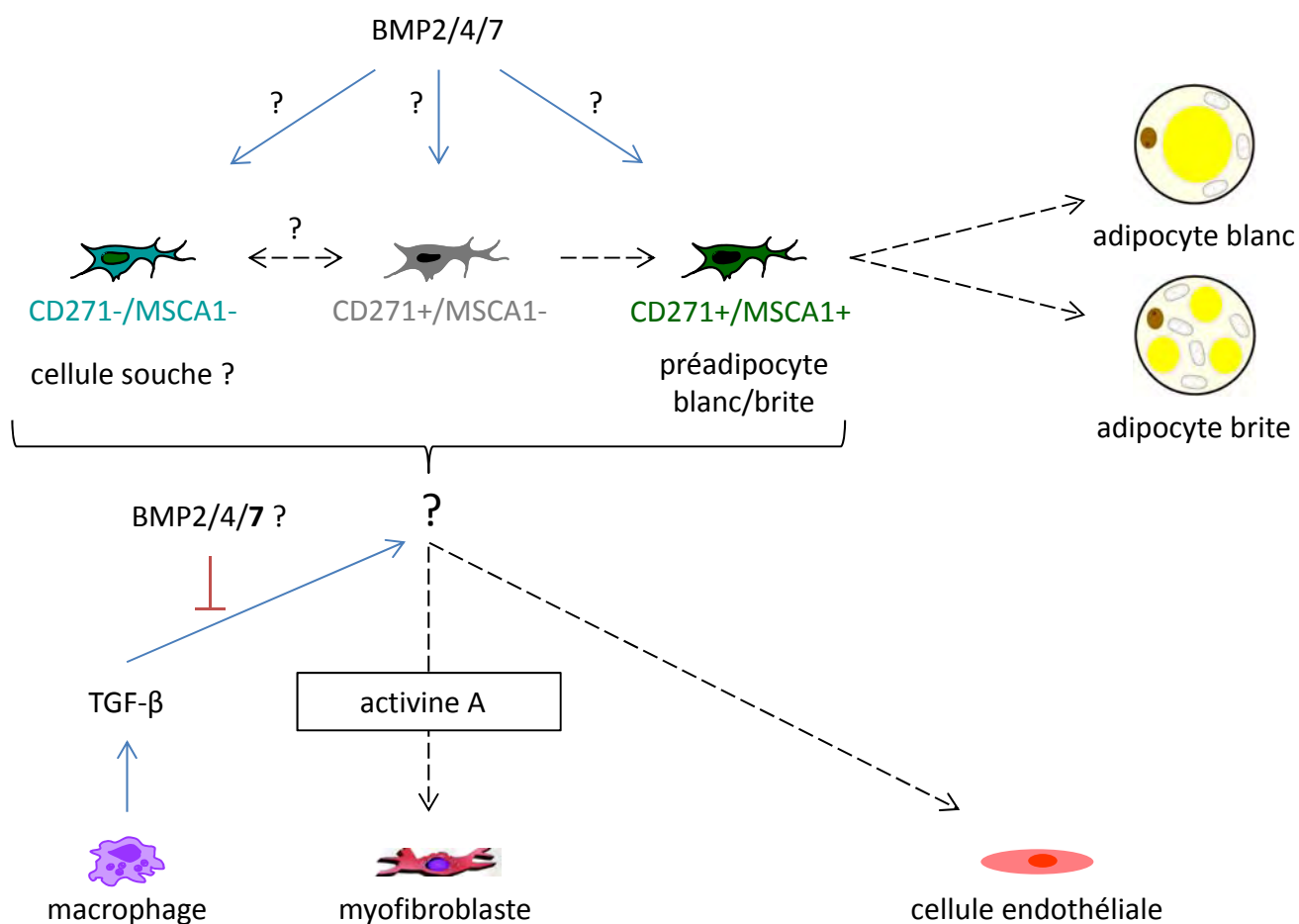


Figure 30 : Perspectives

Le traitement des trois sous-types de cellules progénitrices isolés par les BMP2/4/7 permettra de confirmer que les BMP2/4 agissent uniquement sur l'étape de la différenciation adipocytaire et de préciser si BMP7 agit sur l'engagement et/ou la différenciation.

La caractérisation des sous-types CD271-/MSCA1- et CD271+/MSCA1- permettra de déterminer s'ils correspondent à des états différents du processus d'adipogenèse. Le phénotype intermédiaire des cellules CD271+/MSCA1- sera à confirmer ainsi que le phénotype « souche » des cellules CD271-/MSCA1-. Leurs phénotypes pourront être validés par l'étude de l'expression de marqueurs des cellules souches ainsi que de leurs potentiels de différenciation endothéliale et myofibroblastique.

Le TGF-β, sécrété par les macrophages, induit la production d'activine A par les cellules progénitrices qui agit de façon autocrine et promeut leur différenciation myofibroblastique. Le ou les sous-types de cellules progénitrices impliqués devront être identifiés. Est-ce qu'un sous-type est la cible préférentielle du TGF-β et sécrète l'activine A ? Est-ce le même sous-type qui est le précurseur myofibroblastique ? Enfin, les capacités anti-fibrotiques des BMP2/4 et particulièrement BMP7, devront être étudiées. Ces travaux permettront de déterminer si les BMPs sont capables de prévenir et/ou de reverser la fibrose dans le TA humain.

Références bibliographiques

- Abate N, Garg A, Peshock RM, Stray-Gundersen J, Adams-Huet B, Grundy SM** (1996) Relationship of generalized and regional adiposity to insulin sensitivity in men with NIDDM. *Diabetes* **45**: 1684-1693
- Ahrens M, Ankenbauer T, Schroder D, Hollnagel A, Mayer H, Gross G** (1993) Expression of human bone morphogenetic proteins-2 or -4 in murine mesenchymal progenitor C3H10T1/2 cells induces differentiation into distinct mesenchymal cell lineages. *DNA Cell Biol* **12**: 871-880
- Albilia JB, Tenenbaum HC, Clokie CM, Walt DR, Baker GI, Psutka DJ, Backstein D, Peel SA** (2013) Serum levels of BMP-2, 4, 7 and AHSR in patients with degenerative joint disease requiring total arthroplasty of the hip and temporomandibular joints. *J Orthop Res* **31**: 44-52
- Anderson GJ, Darshan D** (2008) Small-molecule dissection of BMP signaling. *Nat Chem Biol* **4**: 15-16
- Anderson HC, Hodges PT, Aguilera XM, Missana L, Moylan PE** (2000) Bone morphogenetic protein (BMP) localization in developing human and rat growth plate, metaphysis, epiphysis, and articular cartilage. *J Histochem Cytochem* **48**: 1493-1502
- Aouadi M, Jager J, Laurent K, Gonzalez T, Cormont M, Binetruy B, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF, Bost F** (2007) p38MAP Kinase activity is required for human primary adipocyte differentiation. *FEBS Lett* **581**: 5591-5596
- Au-Yong IT, Thorn N, Ganatra R, Perkins AC, Symonds ME** (2009) Brown adipose tissue and seasonal variation in humans. *Diabetes* **58**: 2583-2587
- Baglioni S, Cantini G, Poli G, Francalanci M, Squecco R, Di Franco A, Borgogni E, Frontera S, Nesi G, Liotta F, Lucchese M, Perigli G, Francini F, Forti G, Serio M, Luconi M** (2012) Functional differences in visceral and subcutaneous fat pads originate from differences in the adipose stem cell. *PLoS One* **7**: e36569
- Baglioni S, Francalanci M, Squecco R, Lombardi A, Cantini G, Angeli R, Gelmini S, Guasti D, Benvenuti S, Annunziato F, Bani D, Liotta F, Francini F, Perigli G, Serio M, Luconi M** (2009) Characterization of human adult stem-cell populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue. *Faseb J* **23**: 3494-3505
- Barbatelli G, Murano I, Madsen L, Hao Q, Jimenez M, Kristiansen K, Giacobino JP, De Matteis R, Cinti S** (2010) The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **298**: E1244-1253
- Bartelt A, Heeren J** (2014) Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat Rev Endocrinol* **10**: 24-36
- Battula VL, Trembl S, Bareiss PM, Gieseke F, Roelofs H, de Zwart P, Muller I, Schewe B, Skutella T, Fibbe WE, Kanz L, Buhning HJ** (2009) Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1. *Haematologica* **94**: 173-184
- Bellance N, Lestienne P, Rossignol R** (2009) Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis. *Front Biosci (Landmark Ed)* **14**: 4015-4034
- Beranger GE, Karbiener M, Barquissau V, Pisani DF, Scheideler M, Langin D, Amri EZ** (2012) In vitro brown and "brite"/"beige" adipogenesis: human cellular models and molecular aspects. *Biochim Biophys Acta* **1831**: 905-914
- Berry R, Jeffery E, Rodeheffer MS** (2014) Weighing in on adipocyte precursors. *Cell Metab* **19**: 8-20
- Berry R, Rodeheffer MS** (2013) Characterization of the adipocyte cellular lineage in vivo. *Nat Cell Biol* **15**: 302-308

- Billon N, Dani C** (2012) Developmental origins of the adipocyte lineage: new insights from genetics and genomics studies. *Stem Cell Rev* **8**: 55-66
- Billon N, Iannarelli P, Monteiro MC, Glavieux-Pardanaud C, Richardson WD, Kessar N, Dani C, Dupin E** (2007) The generation of adipocytes by the neural crest. *Development* **134**: 2283-2292
- Bishop GB, Einhorn TA** (2007) Current and future clinical applications of bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery. *Int Orthop* **31**: 721-727
- Bjorntorp P** (1990) "Portal" adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes. *Arteriosclerosis* **10**: 493-496
- Bluher S, Schwarz P** (2014) Metabolically healthy obesity from childhood to adulthood - Does weight status alone matter? *Metabolism* **63**: 1084-1092
- Bordicchia M, Liu D, Amri EZ, Ailhaud G, Dessi-Fulgheri P, Zhang C, Takahashi N, Sarzani R, Collins S** (2012) Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *J Clin Invest* **122**: 1022-1036
- Bostrom P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, Rasbach KA, Bostrom EA, Choi JH, Long JZ, Kajimura S, Zingaretti MC, Vind BF, Tu H, Cinti S, Hojlund K, Gygi SP, Spiegelman BM** (2012) A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* **481**: 463-468
- Bottcher Y, Unbehauen H, Kloting N, Ruschke K, Korner A, Schleinitz D, Tonjes A, Enigk B, Wolf S, Dietrich K, Koriath M, Scholz GH, Tseng YH, Dietrich A, Schon MR, Kiess W, Stumvoll M, Bluher M, Kovacs P** (2009) Adipose tissue expression and genetic variants of the bone morphogenetic protein receptor 1A gene (BMPRI1A) are associated with human obesity. *Diabetes* **58**: 2119-2128
- Boulet N, Esteve D, Bouloumie A, Galitzky J** (2013) Cellular heterogeneity in superficial and deep subcutaneous adipose tissues in overweight patients. *J Physiol Biochem* **69**: 575-583
- Bouletreau PJ, Warren SM, Spector JA, Peled ZM, Gerrets RP, Greenwald JA, Longaker MT** (2002) Hypoxia and VEGF up-regulate BMP-2 mRNA and protein expression in microvascular endothelial cells: implications for fracture healing. *Plast Reconstr Surg* **109**: 2384-2397
- Bouloumie A, Drexler HC, Lafontan M, Busse R** (1998) Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. *Circ Res* **83**: 1059-1066
- Bourlier V, Sengenès C, Zakaroff-Girard A, Decaunes P, Wdziekonski B, Galitzky J, Villageois P, Esteve D, Chiotasso P, Dani C, Bouloumie A** (2012) TGF β family members are key mediators in the induction of myofibroblast phenotype of human adipose tissue progenitor cells by macrophages. *PLoS One* **7**: e31274
- Bourlier V, Zakaroff-Girard A, Miranville A, De Barros S, Maumus M, Sengenès C, Galitzky J, Lafontan M, Karpe F, Frayn KN, Bouloumie A** (2008) Remodeling phenotype of human subcutaneous adipose tissue macrophages. *Circulation* **117**: 806-815
- Bowers RR, Lane MD** (2007) A role for bone morphogenetic protein-4 in adipocyte development. *Cell Cycle* **6**: 385-389
- Bracken AP, Ciro M, Cocito A, Helin K** (2004) E2F target genes: unraveling the biology. *Trends Biochem Sci* **29**: 409-417
- Braga M, Reddy ST, Vergnes L, Pervin S, Grijalva V, Stout D, David J, Li X, Tomasian V, Reid CB, Norris KC, Devaskar SU, Reue K, Singh R** (2014) Follistatin promotes adipocyte differentiation, browning, and energy metabolism. *J Lipid Res* **55**: 375-384
- Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, King D, Julian J, Nohe A** (2011) Bone morphogenetic proteins: a critical review. *Cell Signal* **23**: 609-620
- Brey CW, Nelder MP, Hailemariam T, Gaugler R, Hashmi S** (2009) Kruppel-like family of transcription factors: an emerging new frontier in fat biology. *Int J Biol Sci* **5**: 622-636

- Buchwald H, Estok R, Fahrbach K, Banel D, Jensen MD, Pories WJ, Bantle JP, Sledge I** (2009) Weight and type 2 diabetes after bariatric surgery: systematic review and meta-analysis. *Am J Med* **122**: 248-256 e245
- Buhring HJ, Trembl S, Cerabona F, de Zwart P, Kanz L, Sobiesiak M** (2009) Phenotypic characterization of distinct human bone marrow-derived MSC subsets. *Ann N Y Acad Sci* **1176**: 124-134
- Busetto L, Tregnaghi A, Bussolotto M, Sergi G, Beninca P, Ceccon A, Giantin V, Fiore D, Enzi G** (2000) Visceral fat loss evaluated by total body magnetic resonance imaging in obese women operated with laparoscopic adjustable silicone gastric banding. *Int J Obes Relat Metab Disord* **24**: 60-69
- Cannon B, Nedergaard J** (2004) Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* **84**: 277-359
- Cannon B, Nedergaard J** (2008) Developmental biology: Neither fat nor flesh. *Nature* **454**: 947-948
- Cao Z, Umek RM, McKnight SL** (1991) Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev* **5**: 1538-1552
- Carpene C, Galitzky J, Fontana E, Atgie C, Lafontan M, Berlan M** (1999) Selective activation of beta3-adrenoceptors by octopamine: comparative studies in mammalian fat cells. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* **359**: 310-321
- Castro AV, Woolcott OO, Iyer MS, Kabir M, Ionut V, Stefanovski D, Kolka CM, Szczepaniak LS, Szczepaniak EW, Asare-Bediako I, Paszkiewicz RL, Broussard JL, Kim SP, Kirkman EL, Rios HC, Mkrtchyan H, Wu Q, Ader M, Bergman RN** (2014) Increase in visceral fat Per Se does not induce insulin resistance in the canine model. *Obesity (Silver Spring)*
- Cereijo R, Giral M, Villarroja F** (2014) Thermogenic brown and beige/brite adipogenesis in humans. *Ann Med*: 1-9
- Chau YY, Bandiera R, Serrels A, Martinez-Estrada OM, Qing W, Lee M, Slight J, Thornburn A, Berry R, McHaffie S, Stimson RH, Walker BR, Chapuli RM, Schedl A, Hastie N** (2014) Visceral and subcutaneous fat have different origins and evidence supports a mesothelial source. *Nat Cell Biol* **16**: 367-375
- Chechi K, Nedergaard J, Richard D** (2013) Brown adipose tissue as an anti-obesity tissue in humans. *Obes Rev* **15**: 92-106
- Chen TL, Shen WJ, Kraemer FB** (2001) Human BMP-7/OP-1 induces the growth and differentiation of adipocytes and osteoblasts in bone marrow stromal cell cultures. *J Cell Biochem* **82**: 187-199
- Chen Z, Torrens JJ, Anand A, Spiegelman BM, Friedman JM** (2005) Krox20 stimulates adipogenesis via C/EBPbeta-dependent and -independent mechanisms. *Cell Metab* **1**: 93-106
- Christy RJ, Kaestner KH, Geiman DE, Lane MD** (1991) CCAAT/enhancer binding protein gene promoter: binding of nuclear factors during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 2593-2597
- Clarke SL, Robinson CE, Gimble JM** (1997) CAAT/enhancer binding proteins directly modulate transcription from the peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 promoter. *Biochem Biophys Res Commun* **240**: 99-103
- Corvera S, Gealekman O** (2014) Adipose tissue angiogenesis: impact on obesity and type-2 diabetes. *Biochim Biophys Acta* **1842**: 463-472
- Cristancho AG, Lazar MA** (2011) Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**: 722-734
- Csiszar A, Smith KE, Koller A, Kaley G, Edwards JG, Ungvari Z** (2005) Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression in endothelial cells: role of nuclear factor-kappaB activation by tumor necrosis factor-alpha, H2O2, and high intravascular pressure. *Circulation* **111**: 2364-2372
- Cypess AM, Chen YC, Sze C, Wang K, English J, Chan O, Holman AR, Tal I, Palmer MR, Kolodny GM, Kahn CR** (2012) Cold but not sympathomimetics activates human brown adipose tissue in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 10001-10005

- Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng YH, Doria A, Kolodny GM, Kahn CR** (2009) Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* **360**: 1509-1517
- Cypess AM, Zhang H, Schulz TJ, Huang TL, Espinoza DO, Kristiansen K, Unterman TG, Tseng YH** (2011) Insulin/IGF-I regulation of necdin and brown adipocyte differentiation via CREB- and FoxO1-associated pathways. *Endocrinology* **152**: 3680-3689
- Dani C** (2013) Activins in adipogenesis and obesity. *Int J Obes (Lond)* **37**: 163-166
- Darimont C, Zbinden I, Avanti O, Leone-Vautravers P, Giusti V, Burckhardt P, Pfeifer AM, Mace K** (2003) Reconstitution of telomerase activity combined with HPV-E7 expression allow human preadipocytes to preserve their differentiation capacity after immortalization. *Cell Death Differ* **10**: 1025-1031
- Dattilo AM, Kris-Etherton PM** (1992) Effects of weight reduction on blood lipids and lipoproteins: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr* **56**: 320-328
- Divoux A, Tordjman J, Lacasa D, Veyrie N, Hugol D, Aissat A, Basdevant A, Guerre-Millo M, Poitou C, Zucker JD, Bedossa P, Clement K** (2010) Fibrosis in human adipose tissue: composition, distribution, and link with lipid metabolism and fat mass loss. *Diabetes* **59**: 2817-2825
- Donath MY** (2014) Targeting inflammation in the treatment of type 2 diabetes: time to start. *Nat Rev Drug Discov* **13**: 465-476
- Dudley AT, Lyons KM, Robertson EJ** (1995) A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes Dev* **9**: 2795-2807
- Duffaut C, Galitzky J, Lafontan M, Bouloumie A** (2009) Unexpected trafficking of immune cells within the adipose tissue during the onset of obesity. *Biochem Biophys Res Commun* **384**: 482-485
- Duffaut C, Zakaroff-Girard A, Bourlier V, Decaunes P, Maumus M, Chiotasso P, Sengenès C, Lafontan M, Galitzky J, Bouloumie A** (2009) Interplay between human adipocytes and T lymphocytes in obesity: CCL20 as an adipochemokine and T lymphocytes as lipogenic modulators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**: 1608-1614
- Elabd C, Chiellini C, Carmona M, Galitzky J, Cochet O, Petersen R, Penicaud L, Kristiansen K, Bouloumie A, Casteilla L, Dani C, Ailhaud G, Amri EZ** (2009) Human multipotent adipose-derived stem cells differentiate into functional brown adipocytes. *Stem Cells* **27**: 2753-2760
- Elabd C, Chiellini C, Massoudi A, Cochet O, Zaragosi LE, Trojani C, Michiels JF, Weiss P, Carle G, Rochet N, Dechesne CA, Ailhaud G, Dani C, Amri EZ** (2007) Human adipose tissue-derived multipotent stem cells differentiate in vitro and in vivo into osteocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* **361**: 342-348
- Elsen M, Raschke S, Eckel J** (2014) Browning of white fat: does irisin play a role in humans? *J Endocrinol* **222**: R25-38
- Elsen M, Raschke S, Tennagels N, Schwahn U, Jelenik T, Roden M, Romacho T, Eckel J** (2014) BMP4 and BMP7 induce the white-to-brown transition of primary human adipose stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **306**: C431-440
- Enerback S** (2010) Human brown adipose tissue. *Cell Metab* **11**: 248-252
- Ericsson J, Jackson SM, Kim JB, Spiegelman BM, Edwards PA** (1997) Identification of glycerol-3-phosphate acyltransferase as an adipocyte determination and differentiation factor 1- and sterol regulatory element-binding protein-responsive gene. *J Biol Chem* **272**: 7298-7305
- Fabbrini E, Tamboli RA, Magkos F, Marks-Shulman PA, Eckhauser AW, Richards WO, Klein S, Abumrad NN** (2010) Surgical removal of omental fat does not improve insulin sensitivity and cardiovascular risk factors in obese adults. *Gastroenterology* **139**: 448-455
- Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW** (2004) Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* **145**: 2273-2282

- Fajas L** (2003) Adipogenesis: a cross-talk between cell proliferation and cell differentiation. *Ann Med* **35**: 79-85
- Fajas L, Schoonjans K, Gelman L, Kim JB, Najib J, Martin G, Fruchart JC, Briggs M, Spiegelman BM, Auwerx J** (1999) Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Mol Cell Biol* **19**: 5495-5503
- Farmer SR** (2006) Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab* **4**: 263-273
- Fisher FM, Kleiner S, Douris N, Fox EC, Mepani RJ, Verdeguer F, Wu J, Kharitonov A, Flier JS, Maratos-Flier E, Spiegelman BM** (2012) FGF21 regulates PGC-1alpha and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev* **26**: 271-281
- Flanagan JN, Linder K, Mejhert N, Dungner E, Wahlen K, Decaunes P, Ryden M, Bjorklund P, Arver S, Bhasin S, Bouloumie A, Arner P, Dahlman I** (2009) Role of follistatin in promoting adipogenesis in women. *J Clin Endocrinol Metab* **94**: 3003-3009
- Fox KE, Fankell DM, Erickson PF, Majka SM, Crossno JT, Jr., Klemm DJ** (2006) Depletion of cAMP-response element-binding protein/ATF1 inhibits adipogenic conversion of 3T3-L1 cells ectopically expressing CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) alpha, C/EBP beta, or PPAR gamma 2. *J Biol Chem* **281**: 40341-40353
- Fujimoto T, Parton RG** (2011) Not just fat: the structure and function of the lipid droplet. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**
- Galanakis CG, Daskalakis M, Manios A, Xyda A, Karantanis AH, Melissas J** (2014) Computed Tomography-Based Assessment of Abdominal Adiposity Changes and Their Impact on Metabolic Alterations Following Bariatric Surgery. *World J Surg*
- Galgani JE, Moro C, Ravussin E** (2008) Metabolic flexibility and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **295**: E1009-1017
- Gao X, Cao Y, Yang W, Duan C, Aronson JF, Rastellini C, Chao C, Hellmich MR, Ko TC** (2013) BMP2 inhibits TGF-beta-induced pancreatic stellate cell activation and extracellular matrix formation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **304**: G804-813
- Gesta S, Bluher M, Yamamoto Y, Norris AW, Berndt J, Kralisch S, Boucher J, Lewis C, Kahn CR** (2006) Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 6676-6681
- Gesta S, Tseng YH, Kahn CR** (2007) Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* **131**: 242-256
- Giordano A, Smorlesi A, Frontini A, Barbatelli G, Cinti S** (2014) White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ. *Eur J Endocrinol* **170**: R159-171
- Graves RA, Tontonoz P, Spiegelman BM** (1992) Analysis of a tissue-specific enhancer: ARF6 regulates adipogenic gene expression. *Mol Cell Biol* **12**: 1202-1208
- Gray SL, Vidal-Puig AJ** (2007) Adipose tissue expandability in the maintenance of metabolic homeostasis. *Nutr Rev* **65**: S7-12
- Green H, Kehinde O** (1975) An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* **5**: 19-27
- Green H, Kehinde O** (1976) Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. *Cell* **7**: 105-113
- Green H, Kehinde O** (1979) Formation of normally differentiated subcutaneous fat pads by an established preadipose cell line. *J Cell Physiol* **101**: 169-171
- Green H, Meuth M** (1974) An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* **3**: 127-133
- Gunawardana SC, Piston DW** (2012) Reversal of type 1 diabetes in mice by brown adipose tissue transplant. *Diabetes* **61**: 674-682

- Gupta RK, Arany Z, Seale P, Mepani RJ, Ye L, Conroe HM, Roby YA, Kulaga H, Reed RR, Spiegelman BM** (2010) Transcriptional control of preadipocyte determination by Zfp423. *Nature* **464**: 619-623
- Gupta RK, Mepani RJ, Kleiner S, Lo JC, Khandekar MJ, Cohen P, Frontini A, Bhowmick DC, Ye L, Cinti S, Spiegelman BM** (2012) Zfp423 expression identifies committed preadipocytes and localizes to adipose endothelial and perivascular cells. *Cell Metab* **15**: 230-239
- Gustafson B, Smith U** (2012) The WNT inhibitor Dickkopf 1 and bone morphogenetic protein 4 rescue adipogenesis in hypertrophic obesity in humans. *Diabetes* **61**: 1217-1224
- Hammarstedt A, Hedjazifar S, Jenndahl L, Gogg S, Grunberg J, Gustafson B, Klimcakova E, Stich V, Langin D, Laakso M, Smith U** (2013) WISP2 regulates preadipocyte commitment and PPARgamma activation by BMP4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 2563-2568
- Hansen JB, Jorgensen C, Petersen RK, Hallenborg P, De Matteis R, Boye HA, Petrovic N, Enerback S, Nedergaard J, Cinti S, te Riele H, Kristiansen K** (2004) Retinoblastoma protein functions as a molecular switch determining white versus brown adipocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 4112-4117
- Hansen JB, Kristiansen K** (2006) Regulatory circuits controlling white versus brown adipocyte differentiation. *Biochem J* **398**: 153-168
- Harms M, Seale P** (2013) Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med* **19**: 1252-1263
- Hata A, Shi Y, Massague J** (1998) TGF-beta signaling and cancer: structural and functional consequences of mutations in Smads. *Mol Med Today* **4**: 257-262
- Hata K, Nishimura R, Ikeda F, Yamashita K, Matsubara T, Nokubi T, Yoneda T** (2003) Differential roles of Smad1 and p38 kinase in regulation of peroxisome proliferator-activating receptor gamma during bone morphogenetic protein 2-induced adipogenesis. *Mol Biol Cell* **14**: 545-555
- Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, Cai J, Xu YY, Grinnell BW, Richardson MA, Topper JN, Gimbrone MA, Jr., Wrana JL, Falb D** (1997) The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell* **89**: 1165-1173
- Heath ML, Kow L, Slavotinek JP, Valentine R, Toouli J, Thompson CH** (2009) Abdominal adiposity and liver fat content 3 and 12 months after gastric banding surgery. *Metabolism* **58**: 753-758
- Herrera B, Inman GJ** (2009) A rapid and sensitive bioassay for the simultaneous measurement of multiple bone morphogenetic proteins. Identification and quantification of BMP4, BMP6 and BMP9 in bovine and human serum. *BMC Cell Biol* **10**: 20
- Hino J, Miyazawa T, Miyazato M, Kangawa K** (2011) Bone morphogenetic protein-3b (BMP-3b) is expressed in adipocytes and inhibits adipogenesis as a unique complex. *Int J Obes (Lond)* **36**: 725-734
- Hinoi E, Nakamura Y, Takada S, Fujita H, Iezaki T, Hashizume S, Takahashi S, Odaka Y, Watanabe T, Yoneda Y** (2014) Growth differentiation factor-5 promotes brown adipogenesis in systemic energy expenditure. *Diabetes* **63**: 162-175
- Hirai S, Yamanaka M, Kawachi H, Matsui T, Yano H** (2005) Activin A inhibits differentiation of 3T3-L1 preadipocyte. *Mol Cell Endocrinol* **232**: 21-26
- Hirsch J, Batchelor B** (1976) Adipose tissue cellularity in human obesity. *Clin Endocrinol Metab* **5**: 299-311
- Hogan BL** (1996) Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* **10**: 1580-1594
- Holdstock C, Lind L, Engstrom BE, Ohrvall M, Sundbom M, Larsson A, Karlsson FA** (2005) CRP reduction following gastric bypass surgery is most pronounced in insulin-sensitive subjects. *Int J Obes (Lond)* **29**: 1275-1280

- Hondares E, Iglesias R, Giralt A, Gonzalez FJ, Giralt M, Mampel T, Villarroya F** (2011) Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *J Biol Chem* **286**: 12983-12990
- Huang H, Song TJ, Li X, Hu L, He Q, Liu M, Lane MD, Tang QQ** (2009) BMP signaling pathway is required for commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 12670-12675
- Hummasti S, Laffitte BA, Watson MA, Galardi C, Chao LC, Ramamurthy L, Moore JT, Tontonoz P** (2004) Liver X receptors are regulators of adipocyte gene expression but not differentiation: identification of apoD as a direct target. *J Lipid Res* **45**: 616-625
- Ignatz RA, Massague J** (1985) Type beta transforming growth factor controls the adipogenic differentiation of 3T3 fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 8530-8534
- Ignatz RA, Massague J** (1986) Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* **261**: 4337-4345
- Imamura T, Takase M, Nishihara A, Oeda E, Hanai J, Kawabata M, Miyazono K** (1997) Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature* **389**: 622-626
- Ishibashi J, Seale P** (2010) Medicine. Beige can be slimming. *Science* **328**: 1113-1114
- Itoh F, Asao H, Sugamura K, Heldin CH, ten Dijke P, Itoh S** (2001) Promoting bone morphogenetic protein signaling through negative regulation of inhibitory Smads. *Embo J* **20**: 4132-4142
- Itoh S, Landstrom M, Hermansson A, Itoh F, Heldin CH, Heldin NE, ten Dijke P** (1998) Transforming growth factor beta1 induces nuclear export of inhibitory Smad7. *J Biol Chem* **273**: 29195-29201
- Jespersen NZ, Larsen TJ, Peijs L, Dugaard S, Homoe P, Loft A, de Jong J, Mathur N, Cannon B, Nedergaard J, Pedersen BK, Moller K, Scheele C** (2013) A classical brown adipose tissue mRNA signature partly overlaps with brite in the supraclavicular region of adult humans. *Cell Metab* **17**: 798-805
- Ji X, Chen D, Xu C, Harris SE, Mundy GR, Yoneda T** (2000) Patterns of gene expression associated with BMP-2-induced osteoblast and adipocyte differentiation of mesenchymal progenitor cell 3T3-F442A. *J Bone Miner Metab* **18**: 132-139
- Jin W, Takagi T, Kanesashi SN, Kurahashi T, Nomura T, Harada J, Ishii S** (2006) Schnurri-2 controls BMP-dependent adipogenesis via interaction with Smad proteins. *Dev Cell* **10**: 461-471
- Kajimura S, Seale P, Kubota K, Lunsford E, Frangioni JV, Gygi SP, Spiegelman BM** (2009) Initiation of myoblast to brown fat switch by a PRDM16-C/EBP-beta transcriptional complex. *Nature* **460**: 1154-1158
- Kang Q, Song WX, Luo Q, Tang N, Luo J, Luo X, Chen J, Bi Y, He BC, Park JK, Jiang W, Tang Y, Huang J, Su Y, Zhu GH, He Y, Yin H, Hu Z, Wang Y, Chen L, Zuo GW, Pan X, Shen J, Vokes T, Reid RR, Haydon RC, Luu HH, He TC** (2009) A comprehensive analysis of the dual roles of BMPs in regulating adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells Dev* **18**: 545-559
- Kang S, Akerblad P, Kiviranta R, Gupta RK, Kajimura S, Griffin MJ, Min J, Baron R, Rosen ED** (2012) Regulation of early adipose commitment by Zfp521. *PLoS Biol* **10**: e1001433
- Kazama I, Mahoney Z, Miner JH, Graf D, Economides AN, Kreidberg JA** (2008) Podocyte-derived BMP7 is critical for nephron development. *J Am Soc Nephrol* **19**: 2181-2191
- Kelley DE, Thaete FL, Troost F, Huwe T, Goodpaster BH** (2000) Subdivisions of subcutaneous abdominal adipose tissue and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **278**: E941-948
- Kelly IE, Han TS, Walsh K, Lean ME** (1999) Effects of a thiazolidinedione compound on body fat and fat distribution of patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* **22**: 288-293
- Kikuchi-Utsumi K, Gao B, Ohinata H, Hashimoto M, Yamamoto N, Kuroshima A** (2002) Enhanced gene expression of endothelial nitric oxide synthase in brown adipose tissue during cold exposure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **282**: R623-626

- Kim HS, Liang L, Dean RG, Hausman DB, Hartzell DL, Baile CA** (2001) Inhibition of preadipocyte differentiation by myostatin treatment in 3T3-L1 cultures. *Biochem Biophys Res Commun* **281**: 902-906
- Kim J, Johnson K, Chen HJ, Carroll S, Laughon A** (1997) Drosophila Mad binds to DNA and directly mediates activation of vestigial by Decapentaplegic. *Nature* **388**: 304-308
- Kim JB, Spiegelman BM** (1996) ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev* **10**: 1096-1107
- Kim JB, Wright HM, Wright M, Spiegelman BM** (1998) ADD1/SREBP1 activates PPARgamma through the production of endogenous ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 4333-4337
- Kim WK, Choi HR, Park SG, Ko Y, Bae KH, Lee SC** (2012) Myostatin inhibits brown adipocyte differentiation via regulation of Smad3-mediated beta-catenin stabilization. *Int J Biochem Cell Biol* **44**: 327-334
- Kimura N, Matsuo R, Shibuya H, Nakashima K, Taga T** (2000) BMP2-induced apoptosis is mediated by activation of the TAK1-p38 kinase pathway that is negatively regulated by Smad6. *J Biol Chem* **275**: 17647-17652
- Kinoshita K, Iimuro Y, Otagawa K, Saika S, Inagaki Y, Nakajima Y, Kawada N, Fujimoto J, Friedman SL, Ikeda K** (2007) Adenovirus-mediated expression of BMP-7 suppresses the development of liver fibrosis in rats. *Gut* **56**: 706-714
- Kir S, White JP, Kleiner S, Kazak L, Cohen P, Baracos VE, Spiegelman BM** (2014) Tumour-derived PTH-related protein triggers adipose tissue browning and cancer cachexia. *Nature* **513**: 100-104
- Kishigami S, Mishina Y** (2005) BMP signaling and early embryonic patterning. *Cytokine Growth Factor Rev* **16**: 265-278
- Klaus S, Choy L, Champigny O, Cassard-Doulcier AM, Ross S, Spiegelman B, Ricquier D** (1994) Characterization of the novel brown adipocyte cell line HIB 1B. Adrenergic pathways involved in regulation of uncoupling protein gene expression. *J Cell Sci* **107 (Pt 1)**: 313-319
- Klein S, Fontana L, Young VL, Coggan AR, Kilo C, Patterson BW, Mohammed BS** (2004) Absence of an effect of liposuction on insulin action and risk factors for coronary heart disease. *N Engl J Med* **350**: 2549-2557
- Koenen TB, Tack CJ, Kroese JM, Hermus AR, Sweep FC, van der Laak J, Stalenhoef AF, de Graaf J, van Tits LJ, Stienstra R** (2009) Pioglitazone treatment enlarges subcutaneous adipocytes in insulin-resistant patients. *J Clin Endocrinol Metab* **94**: 4453-4457
- Koinuma D, Shinozaki M, Komuro A, Goto K, Saitoh M, Hanyu A, Ebina M, Nukiwa T, Miyazawa K, Imamura T, Miyazono K** (2003) Arkadia amplifies TGF-beta superfamily signalling through degradation of Smad7. *Embo J* **22**: 6458-6470
- Kovacova Z, Tencerova M, Roussel B, Wedellova Z, Rossmeislova L, Langin D, Polak J, Stich V** (2012) The impact of obesity on secretion of adiponectin multimeric isoforms differs in visceral and subcutaneous adipose tissue. *Int J Obes (Lond)* **36**: 1360-1365
- Kusanagi K, Inoue H, Ishidou Y, Mishima HK, Kawabata M, Miyazono K** (2000) Characterization of a bone morphogenetic protein-responsive Smad-binding element. *Mol Biol Cell* **11**: 555-565
- Kusminski CM, Holland WL, Sun K, Park J, Spurgin SB, Lin Y, Askew GR, Simcox JA, McClain DA, Li C, Scherer PE** (2012) MitoNEET-driven alterations in adipocyte mitochondrial activity reveal a crucial adaptive process that preserves insulin sensitivity in obesity. *Nat Med* **18**: 1539-1549
- Lafontan M** (2008) Advances in adipose tissue metabolism. *Int J Obes (Lond)* **32 Suppl 7**: S39-51
- Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, Volund A, Ehres JA, Seifert B, Mandrup-Poulsen T, Donath MY** (2007) Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* **356**: 1517-1526

- Lavery K, Swain P, Falb D, Alaoui-Ismaili MH** (2008) BMP-2/4 and BMP-6/7 differentially utilize cell surface receptors to induce osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Biol Chem* **283**: 20948-20958
- Lavie CJ, De Schutter A, Milani RV** (2014) Healthy obese versus unhealthy lean: the obesity paradox. *Nat Rev Endocrinol*
- Lee MJ, Wu Y, Fried SK** (2012) A modified protocol to maximize differentiation of human preadipocytes and improve metabolic phenotypes. *Obesity (Silver Spring)* **20**: 2334-2340
- Lee YH, Petkova AP, Mottillo EP, Granneman JG** (2012) In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by beta3-adrenoceptor activation and high-fat feeding. *Cell Metab* **15**: 480-491
- Lefterova MI, Lazar MA** (2009) New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab* **20**: 107-114
- Leonardsson G, Steel JH, Christian M, Pocock V, Milligan S, Bell J, So PW, Medina-Gomez G, Vidal-Puig A, White R, Parker MG** (2004) Nuclear receptor corepressor RIP140 regulates fat accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 8437-8442
- Letexier D, Pinteaur C, Large V, Frering V, Beylot M** (2003) Comparison of the expression and activity of the lipogenic pathway in human and rat adipose tissue. *J Lipid Res* **44**: 2127-2134
- Lima MM, Pareja JC, Alegre SM, Geloneze SR, Kahn SE, Astiarraga BD, Chaim EA, Baracat J, Geloneze B** (2013) Visceral fat resection in humans: effect on insulin sensitivity, beta-cell function, adipokines, and inflammatory markers. *Obesity (Silver Spring)* **21**: E182-189
- Linhart HG, Ishimura-Oka K, DeMayo F, Kibe T, Repka D, Poindexter B, Bick RJ, Darlington GJ** (2001) C/EBPalpha is required for differentiation of white, but not brown, adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 12532-12537
- Liu K, Guan Y, MacNicol MC, MacNicol AM, McGehee RE, Jr.** (2002) Early expression of p107 is associated with 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Mol Cell Endocrinol* **194**: 51-61
- Liu Y, Zhang R, Wang X, Huang F, Yan Z, Nie M, Huang J, Wang Y, Chen L, Yin L, He B, Deng Z** (2014) All-trans retinoic acid modulates bone morphogenic protein 9-induced osteogenesis and adipogenesis of preadipocytes through BMP/Smad and Wnt/beta-catenin signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol* **47**: 47-56
- Loncar D** (1992) Brown adipose tissue as a derivative of mesoderm grafted below the kidney capsule. A model for differentiation of isolated rat mesoderm. *Int J Dev Biol* **36**: 265-274
- Long JZ, Svensson KJ, Tsai L, Zeng X, Roh HC, Kong X, Rao RR, Lou J, Lokurkar I, Baur W, Castellot JJ, Jr., Rosen ED, Spiegelman BM** (2014) A smooth muscle-like origin for beige adipocytes. *Cell Metab* **19**: 810-820
- Lord E, Bergeron E, Senta H, Park H, Faucheux N** (2010) Effect of BMP-9 and its derived peptide on the differentiation of human white preadipocytes. *Growth Factors* **28**: 149-156
- Luo G, Hofmann C, Bronckers AL, Sohocki M, Bradley A, Karsenty G** (1995) BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes Dev* **9**: 2808-2820
- Luo X, Hutley LJ, Webster JA, Kim YH, Liu DF, Newell FS, Widberg CH, Bachmann A, Turner N, Schmitz-Peiffer C, Prins JB, Yang GS, Whitehead JP** (2012) Identification of BMP and activin membrane-bound inhibitor (BAMBI) as a potent negative regulator of adipogenesis and modulator of autocrine/paracrine adipogenic factors. *Diabetes* **61**: 124-136
- Macotela Y, Emanuelli B, Mori MA, Gesta S, Schulz TJ, Tseng YH, Kahn CR** (2012) Intrinsic differences in adipocyte precursor cells from different white fat depots. *Diabetes* **61**: 1691-1699
- Manolopoulos KN, Karpe F, Frayn KN** (2010) Gluteofemoral body fat as a determinant of metabolic health. *Int J Obes (Lond)* **34**: 949-959

- Manolopoulos KN, Karpe F, Frayn KN** (2012) Marked resistance of femoral adipose tissue blood flow and lipolysis to adrenaline in vivo. *Diabetologia* **55**: 3029-3037
- Massague J, Seoane J, Wotton D** (2005) Smad transcription factors. *Genes Dev* **19**: 2783-2810
- Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, Morton NM, Mullins JJ, Seckl JR, Flier JS** (2001) A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science* **294**: 2166-2170
- Mathis D, Shoelson SE** (2011) Immunometabolism: an emerging frontier. *Nat Rev Immunol* **11**: 81
- Matsushita M, Yoneshiro T, Aita S, Kameya T, Sugie H, Saito M** (2014) Impact of brown adipose tissue on body fatness and glucose metabolism in healthy humans. *Int J Obes (Lond)* **38**: 812-817
- Maumus M, Peyrafitte JA, D'Angelo R, Fournier-Wirth C, Bouloumie A, Casteilla L, Sengenès C, Bourin P** (2011) Native human adipose stromal cells: localization, morphology and phenotype. *Int J Obes (Lond)* **35**: 1141-1153
- McCormack N, Molloy EL, O'Dea S** (2013) Bone morphogenetic proteins enhance an epithelial-mesenchymal transition in normal airway epithelial cells during restitution of a disrupted epithelium. *Respir Res* **14**: 36
- McCullough KA, Waits CA, Garimella R, Tague SE, Sipe JB, Anderson HC** (2007) Immunohistochemical localization of bone morphogenetic proteins (BMPs) 2, 4, 6, and 7 during induced heterotopic bone formation. *J Orthop Res* **25**: 465-472
- McLaughlin TM, Liu T, Yee G, Abbasi F, Lamendola C, Reaven GM, Tsao P, Cushman SW, Sherman A** (2012) Pioglitazone increases the proportion of small cells in human abdominal subcutaneous adipose tissue. *Obesity (Silver Spring)* **18**: 926-931
- McPherron AC, Lee SJ** (2002) Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice. *J Clin Invest* **109**: 595-601
- Melicow MM** (1977) One hundred cases of pheochromocytoma (107 tumors) at the Columbia-Presbyterian Medical Center, 1926-1976: a clinicopathological analysis. *Cancer* **40**: 1987-2004
- Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumie A** (2004) Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* **110**: 349-355
- Miyazaki Y, Glass L, Triplitt C, Wajsborg E, Mandarino LJ, DeFronzo RA** (2002) Abdominal fat distribution and peripheral and hepatic insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **283**: E1135-1143
- Miyazaki Y, Mahankali A, Matsuda M, Mahankali S, Hardies J, Cusi K, Mandarino LJ, DeFronzo RA** (2002) Effect of pioglitazone on abdominal fat distribution and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* **87**: 2784-2791
- Modica S, Wolfrum C** (2013) Bone morphogenic proteins signaling in adipogenesis and energy homeostasis. *Biochim Biophys Acta* **1831**: 915-923
- Mohan A, Asselin J, Sargent IL, Groome NP, Muttukrishna S** (2001) Effect of cytokines and growth factors on the secretion of inhibin A, activin A and follistatin by term placental villous trophoblasts in culture. *Eur J Endocrinol* **145**: 505-511
- Monteiro MC, Sanyal M, Cleary ML, Sengenès C, Bouloumie A, Dani C, Billon N** (2011) PBX1: a novel stage-specific regulator of adipocyte development. *Stem Cells* **29**: 1837-1848
- Monzon JR, Basile R, Heneghan S, Udupi V, Green A** (2002) Lipolysis in adipocytes isolated from deep and superficial subcutaneous adipose tissue. *Obes Res* **10**: 266-269
- Mori Y, Murakawa Y, Okada K, Horikoshi H, Yokoyama J, Tajima N, Ikeda Y** (1999) Effect of troglitazone on body fat distribution in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* **22**: 908-912
- Morrone M, Giordano A, Zingaretti MC, Boiani R, De Matteis R, Kahn BB, Nisoli E, Tonello C, Pisoschi C, Luchetti MM, Marelli M, Cinti S** (2004) Reversible transdifferentiation of secretory epithelial cells into adipocytes in the mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 16801-16806

- Moulin K, Truel N, Andre M, Arnauld E, Nibbelink M, Cousin B, Dani C, Penicaud L, Casteilla L** (2001) Emergence during development of the white-adipocyte cell phenotype is independent of the brown-adipocyte cell phenotype. *Biochem J* **356**: 659-664
- Muller PA, Kosco B, Rajani GM, Stevanovic K, Berres ML, Hashimoto D, Mortha A, Leboeuf M, Li XM, Mucida D, Stanley ER, Dahan S, Margolis KG, Gershon MD, Merad M, Bogunovic M** (2014) Crosstalk between muscularis macrophages and enteric neurons regulates gastrointestinal motility. *Cell* **158**: 300-313
- Nakao A, Afrakhte M, Moren A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, Itoh S, Kawabata M, Heldin NE, Heldin CH, ten Dijke P** (1997) Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature* **389**: 631-635
- Nakayama T, Gardner H, Berg LK, Christian JL** (1998) Smad6 functions as an intracellular antagonist of some TGF-beta family members during *Xenopus* embryogenesis. *Genes Cells* **3**: 387-394
- Nedergaard J, Cannon B** (2012) The changed metabolic world with human brown adipose tissue: therapeutic visions. *Cell Metab* **11**: 268-272
- Negrel R, Grimaldi P, Ailhaud G** (1978) Establishment of preadipocyte clonal line from epididymal fat pad of ob/ob mouse that responds to insulin and to lipolytic hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**: 6054-6058
- Nelsen SM, Christian JL** (2009) Site-specific cleavage of BMP4 by furin, PC6, and PC7. *J Biol Chem* **284**: 27157-27166
- Newell FS, Su H, Tornqvist H, Whitehead JP, Prins JB, Hutley LJ** (2006) Characterization of the transcriptional and functional effects of fibroblast growth factor-1 on human preadipocyte differentiation. *Faseb J* **20**: 2615-2617
- Nimrod A, Ryan KJ** (1975) Aromatization of androgens by human abdominal and breast fat tissue. *J Clin Endocrinol Metab* **40**: 367-372
- Nohe A, Keating E, Knaus P, Petersen NO** (2004) Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell Signal* **16**: 291-299
- O'Rahilly S, Farooqi IS, Yeo GS, Challis BG** (2003) Minireview: human obesity-lessons from monogenic disorders. *Endocrinology* **144**: 3757-3764
- O'Rourke RW, Metcalf MD, White AE, Madala A, Winters BR, Maizlin, II, Jobe BA, Roberts CT, Jr., Slifka MK, Marks DL** (2009) Depot-specific differences in inflammatory mediators and a role for NK cells and IFN-gamma in inflammation in human adipose tissue. *Int J Obes (Lond)* **33**: 978-990
- Ohno H, Shinoda K, Spiegelman BM, Kajimura S** (2012) PPARgamma agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein. *Cell Metab* **15**: 395-404
- Okada-Iwabu M, Yamauchi T, Iwabu M, Honma T, Hamagami K, Matsuda K, Yamaguchi M, Tanabe H, Kimura-Someya T, Shirouzu M, Ogata H, Tokuyama K, Ueki K, Nagano T, Tanaka A, Yokoyama S, Kadowaki T** (2013) A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. *Nature* **503**: 493-499
- Orava J, Nuutila P, Lidell ME, Oikonen V, Noponen T, Viljanen T, Scheinin M, Taittonen M, Niemi T, Enerback S, Virtanen KA** (2011) Different metabolic responses of human brown adipose tissue to activation by cold and insulin. *Cell Metab* **14**: 272-279
- Otto TC, Lane MD** (2005) Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **40**: 229-242
- Ozkaynak E, Schnegelsberg PN, Oppermann H** (1991) Murine osteogenic protein (OP-1): high levels of mRNA in kidney. *Biochem Biophys Res Commun* **179**: 116-123
- Park JH, Kang HJ, Kang SI, Lee JE, Hur J, Ge K, Mueller E, Li H, Lee BC, Lee SB** (2013) A multifunctional protein, EWS, is essential for early brown fat lineage determination. *Dev Cell* **26**: 393-404

- Payne VA, Au WS, Lowe CE, Rahman SM, Friedman JE, O'Rahilly S, Rochford JJ** (2009) C/EBP transcription factors regulate SREBP1c gene expression during adipogenesis. *Biochem J* **425**: 215-223
- Peirce V, Carobbio S, Vidal-Puig A** (2014) The different shades of fat. *Nature* **510**: 76-83
- Peng CY, Mukhopadhyay A, Jarrett JC, Yoshikawa K, Kessler JA** (2012) BMP receptor 1A regulates development of hypothalamic circuits critical for feeding behavior. *J Neurosci* **32**: 17211-17224
- Petersen KF, Oral EA, Dufour S, Befroy D, Ariyan C, Yu C, Cline GW, DePaoli AM, Taylor SI, Gorden P, Shulman GI** (2002) Leptin reverses insulin resistance and hepatic steatosis in patients with severe lipodystrophy. *J Clin Invest* **109**: 1345-1350
- Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J** (2010) Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem* **285**: 7153-7164
- Petruzzelli M, Schweiger M, Schreiber R, Campos-Olivas R, Tsoli M, Allen J, Swarbrick M, Rose-John S, Rincon M, Robertson G, Zechner R, Wagner EF** (2014) A switch from white to brown fat increases energy expenditure in cancer-associated cachexia. *Cell Metab* **20**: 433-447
- Pfannenberger C, Werner MK, Ripkens S, Stef I, Deckert A, Schmadl M, Reimold M, Haring HU, Claussen CD, Stefan N** (2010) Impact of age on the relationships of brown adipose tissue with sex and adiposity in humans. *Diabetes* **59**: 1789-1793
- Pisani DF, Djedaini M, Beranger GE, Elabd C, Scheideler M, Ailhaud G, Amri EZ** (2011) Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells into "Brite" (Brown-in-White) Adipocytes. *Front Endocrinol (Lausanne)* **2**: 87
- Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, Andre M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, Duriez M, Tedgui A, Levy B, Penicaud L, Casteilla L** (2004) Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* **109**: 656-663
- Poitou C, Coussieu C, Rouault C, Coupaye M, Canello R, Bedel JF, Gouillon M, Bouillot JL, Oppert JM, Basdevant A, Clement K** (2006) Serum amyloid A: a marker of adiposity-induced low-grade inflammation but not of metabolic status. *Obesity (Silver Spring)* **14**: 309-318
- Qian SW, Tang Y, Li X, Liu Y, Zhang YY, Huang HY, Xue RD, Yu HY, Guo L, Gao HD, Sun X, Li YM, Jia WP, Tang QQ** (2013) BMP4-mediated brown fat-like changes in white adipose tissue alter glucose and energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: E798-807
- Qiu Z, Wei Y, Chen N, Jiang M, Wu J, Liao K** (2001) DNA synthesis and mitotic clonal expansion is not a required step for 3T3-L1 preadipocyte differentiation into adipocytes. *J Biol Chem* **276**: 11988-11995
- Quach JM, Walker EC, Allan E, Solano M, Yokoyama A, Kato S, Sims NA, Gillespie MT, Martin TJ** (2011) Zinc finger protein 467 is a novel regulator of osteoblast and adipocyte commitment. *J Biol Chem* **286**: 4186-4198
- Rajala MW, Scherer PE** (2003) Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology* **144**: 3765-3773
- Ramel MC, Hill CS** (2012) Spatial regulation of BMP activity. *FEBS Lett* **586**: 1929-1941
- Raschke S, Elsen M, Gassenhuber H, Sommerfeld M, Schwahn U, Brockmann B, Jung R, Wisloff U, Tjonna AE, Raastad T, Hallen J, Norheim F, Drevon CA, Romacho T, Eckardt K, Eckel J** (2013) Evidence against a beneficial effect of irisin in humans. *PLoS One* **8**: e73680
- Regazzetti C, Peraldi P, Gremeaux T, Najem-Lendom R, Ben-Sahra I, Cormont M, Bost F, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF, Giorgetti-Peraldi S** (2009) Hypoxia decreases insulin signaling pathways in adipocytes. *Diabetes* **58**: 95-103
- Reichert M, Eick D** (1999) Analysis of cell cycle arrest in adipocyte differentiation. *Oncogene* **18**: 459-466

- Reznikoff CA, Brankow DW, Heidelberger C** (1973) Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of division. *Cancer Res* **33**: 3231-3238
- Ricquier D, Nechad M, Mory G** (1982) Ultrastructural and biochemical characterization of human brown adipose tissue in pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab* **54**: 803-807
- Rodeheffer MS, Birsoy K, Friedman JM** (2008) Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo. *Cell* **135**: 240-249
- Rodriguez AM, Elabd C, Delteil F, Astier J, Vernochet C, Saint-Marc P, Guesnet J, Guezennec A, Amri EZ, Dani C, Ailhaud G** (2004) Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* **315**: 255-263
- Rodriguez AM, Pisani D, Dechesne CA, Turc-Carel C, Kurzenne JY, Wdziekonski B, Villageois A, Bagnis C, Breitmayer JP, Groux H, Ailhaud G, Dani C** (2005) Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J Exp Med* **201**: 1397-1405
- Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, Spiegelman BM** (2002) C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes Dev* **16**: 22-26
- Rosen ED, MacDougald OA** (2006) Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 885-896
- Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM** (1999) PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell* **4**: 611-617
- Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM** (2000) Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* **14**: 1293-1307
- Rosenwald M, Perdikari A, Rulicke T, Wolfrum C** (2013) Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat Cell Biol* **15**: 659-667
- Ross R, Fortier L, Hudson R** (1996) Separate associations between visceral and subcutaneous adipose tissue distribution, insulin and glucose levels in obese women. *Diabetes Care* **19**: 1404-1411
- Ross SE, Erickson RL, Gerin I, DeRose PM, Bajnok L, Longo KA, Misek DE, Kuick R, Hanash SM, Atkins KB, Andresen SM, Nebb HI, Madsen L, Kristiansen K, MacDougald OA** (2002) Microarray analyses during adipogenesis: understanding the effects of Wnt signaling on adipogenesis and the roles of liver X receptor alpha in adipocyte metabolism. *Mol Cell Biol* **22**: 5989-5999
- Ross SR, Choy L, Graves RA, Fox N, Solevjeva V, Klaus S, Ricquier D, Spiegelman BM** (1992) Hibernoma formation in transgenic mice and isolation of a brown adipocyte cell line expressing the uncoupling protein gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 7561-7565
- Roux C, Pisani DF, Yahia HB, Djedaini M, Beranger GE, Chambard JC, Ambrosetti D, Michiels JF, Breuil V, Ailhaud G, Euller-Ziegler L, Amri EZ** (2013) Chondrogenic potential of stem cells derived from adipose tissue: a powerful pharmacological tool. *Biochem Biophys Res Commun* **440**: 786-791
- Sacks H, Symonds ME** (2013) Anatomical locations of human brown adipose tissue: functional relevance and implications in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* **62**: 1783-1790
- Sagi B, Maraghechi P, Urban VS, Hegyi B, Szigeti A, Fajka-Boja R, Kudlik G, Nemet K, Monostori E, Gocza E, Uher F** (2012) Positional identity of murine mesenchymal stem cells resident in different organs is determined in the postsegmentation mesoderm. *Stem Cells Dev* **21**: 814-828
- Saini S, Duraisamy AJ, Bayen S, Vats P, Singh SB** (2014) Role of BMP7 in appetite regulation, adipogenesis, and energy expenditure. *Endocrine*
- Samuel VT, Shulman GI** (2012) Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell* **148**: 852-871

- Sanchez-Gurmaches J, Hung CM, Sparks CA, Tang Y, Li H, Guertin DA** (2012) PTEN loss in the Myf5 lineage redistributes body fat and reveals subsets of white adipocytes that arise from Myf5 precursors. *Cell Metab* **16**: 348-362
- Scheele C, Larsen TJ, Nielsen S** (2014) Novel nuances of human brown fat. *Adipocyte* **3**: 54-57
- Schleinitz D, Kloting N, Bottcher Y, Wolf S, Dietrich K, Tonjes A, Breitfeld J, Enigk B, Halbritter J, Korner A, Schon MR, Jenkner J, Tseng YH, Lohmann T, Dressler M, Stumvoll M, Bluher M, Kovacs P** (2011) Genetic and evolutionary analyses of the human bone morphogenetic protein receptor 2 (BMP2) in the pathophysiology of obesity. *PLoS One* **6**: e16155
- Schulz TJ, Huang P, Huang TL, Xue R, McDougall LE, Townsend KL, Cypess AM, Mishina Y, Gussoni E, Tseng YH** (2013) Brown-fat paucity due to impaired BMP signalling induces compensatory browning of white fat. *Nature* **495**: 379-383
- Schulz TJ, Huang TL, Tran TT, Zhang H, Townsend KL, Shadrach JL, Cerletti M, McDougall LE, Giorgadze N, Tchkonina T, Schrier D, Falb D, Kirkland JL, Wagers AJ, Tseng YH** (2011) Identification of inducible brown adipocyte progenitors residing in skeletal muscle and white fat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 143-148
- Schulz TJ, Tseng YH** (2009) Emerging role of bone morphogenetic proteins in adipogenesis and energy metabolism. *Cytokine Growth Factor Rev* **20**: 523-531
- Schulz TJ, Tseng YH** (2013) Systemic control of brown fat thermogenesis: integration of peripheral and central signals. *Ann N Y Acad Sci* **1302**: 35-41
- Scott MA, Nguyen VT, Levi B, James AW** (2011) Current methods of adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* **20**: 1793-1804
- Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S, Scime A, Devarakonda S, Conroe HM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Rudnicki MA, Beier DR, Spiegelman BM** (2008) PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* **454**: 961-967
- Seale P, Conroe HM, Estall J, Kajimura S, Frontini A, Ishibashi J, Cohen P, Cinti S, Spiegelman BM** (2011) Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J Clin Invest* **121**: 96-105
- Seale P, Kajimura S, Yang W, Chin S, Rohas LM, Uldry M, Tavernier G, Langin D, Spiegelman BM** (2007) Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell Metab* **6**: 38-54
- Sengenès C, Berlan M, De Glisezinski I, Lafontan M, Galitzky J** (2000) Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes. *Faseb J* **14**: 1345-1351
- Sengenès C, Lolmede K, Zakaroff-Girard A, Busse R, Bouloumie A** (2005) Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells. *J Cell Physiol* **205**: 114-122
- Seo JB, Moon HM, Kim WS, Lee YS, Jeong HW, Yoo EJ, Ham J, Kang H, Park MG, Steffensen KR, Stulnig TM, Gustafsson JA, Park SD, Kim JB** (2004) Activated liver X receptors stimulate adipocyte differentiation through induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression. *Mol Cell Biol* **24**: 3430-3444
- Sepe A, Tchkonina T, Thomou T, Zamboni M, Kirkland JL** (2010) Aging and regional differences in fat cell progenitors - a mini-review. *Gerontology* **57**: 66-75
- Shahparaki A, Grunder L, Sorisky A** (2002) Comparison of human abdominal subcutaneous versus omental preadipocyte differentiation in primary culture. *Metabolism* **51**: 1211-1215
- Sharma A, Huard C, Vernochet C, Ziemek D, Knowlton KM, Tyminski E, Paradis T, Zhang Y, Jones JE, von Schack D, Brown CT, Milos PM, Coyle AJ, Tremblay F, Martinez RV** (2014) Brown fat determination and development from muscle precursor cells by novel action of bone morphogenetic protein 6. *PLoS One* **9**: e92608

- Sharp LZ, Shinoda K, Ohno H, Scheel DW, Tomoda E, Ruiz L, Hu H, Wang L, Pavlova Z, Gilsanz V, Kajimura S** (2012) Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. *PLoS One* **7**: e49452
- Shi W, Chang C, Nie S, Xie S, Wan M, Cao X** (2007) Endofin acts as a Smad anchor for receptor activation in BMP signaling. *J Cell Sci* **120**: 1216-1224
- Shi Y, Wang YF, Jayaraman L, Yang H, Massague J, Pavletich NP** (1998) Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling. *Cell* **94**: 585-594
- Shimano H, Shimomura I, Hammer RE, Herz J, Goldstein JL, Brown MS, Horton JD** (1997) Elevated levels of SREBP-2 and cholesterol synthesis in livers of mice homozygous for a targeted disruption of the SREBP-1 gene. *J Clin Invest* **100**: 2115-2124
- Shoji T, Ii M, Mifune Y, Matsumoto T, Kawamoto A, Kwon SM, Kuroda T, Kuroda R, Kurosaka M, Asahara T** (2010) Local transplantation of human multipotent adipose-derived stem cells accelerates fracture healing via enhanced osteogenesis and angiogenesis. *Lab Invest* **90**: 637-649
- Sieber C, Kopf J, Hiepen C, Knaus P** (2009) Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* **20**: 343-355
- Silva JE, Larsen PR** (1983) Adrenergic activation of triiodothyronine production in brown adipose tissue. *Nature* **305**: 712-713
- Simone S, Cosola C, Loverre A, Cariello M, Sallustio F, Rascio F, Gesualdo L, Schena FP, Grandaliano G, Pertosa G** (2012) BMP-2 induces a profibrotic phenotype in adult renal progenitor cells through Nox4 activation. *Am J Physiol Renal Physiol* **303**: F23-34
- Sipe JB, Zhang J, Waits C, Skikne B, Garimella R, Anderson HC** (2004) Localization of bone morphogenetic proteins (BMPs)-2, -4, and -6 within megakaryocytes and platelets. *Bone* **35**: 1316-1322
- Sjostrom L, Lindroos AK, Peltonen M, Torgerson J, Bouchard C, Carlsson B, Dahlgren S, Larsson B, Narbro K, Sjostrom CD, Sullivan M, Wedel H** (2004) Lifestyle, diabetes, and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery. *N Engl J Med* **351**: 2683-2693
- Skurk T, Ecklebe S, Hauner H** (2007) A novel technique to propagate primary human preadipocytes without loss of differentiation capacity. *Obesity (Silver Spring)* **15**: 2925-2931
- Smith SR, Lovejoy JC, Greenway F, Ryan D, deJonge L, de la Bretonne J, Volafava J, Bray GA** (2001) Contributions of total body fat, abdominal subcutaneous adipose tissue compartments, and visceral adipose tissue to the metabolic complications of obesity. *Metabolism* **50**: 425-435
- Sobiesiak M, Sivasubramanian K, Hermann C, Tan C, Orgel M, Trembl S, Cerabona F, de Zwart P, Ochs U, Muller CA, Gargett CE, Kalbacher H, Buhning HJ** (2010) The mesenchymal stem cell antigen MSCA-1 is identical to tissue non-specific alkaline phosphatase. *Stem Cells Dev* **19**: 669-677
- Son JW, Kim MK, Park YM, Baek KH, Yoo SJ, Song KH, Son HS, Yoon KH, Lee WC, Cha BY, Son HY, Kwon HS** (2011) Association of serum bone morphogenetic protein 4 levels with obesity and metabolic syndrome in non-diabetic individuals. *Endocr J* **58**: 39-46
- Sorescu GP, Song H, Tressel SL, Hwang J, Dikalov S, Smith DA, Boyd NL, Platt MO, Lassegue B, Griending KK, Jo H** (2004) Bone morphogenetic protein 4 produced in endothelial cells by oscillatory shear stress induces monocyte adhesion by stimulating reactive oxygen species production from a Nox1-based NADPH oxidase. *Circ Res* **95**: 773-779
- Sottile V, Seuwen K** (2000) Bone morphogenetic protein-2 stimulates adipogenic differentiation of mesenchymal precursor cells in synergy with BRL 49653 (rosiglitazone). *FEBS Lett* **475**: 201-204
- Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, Blomqvist L, Hoffstedt J, Naslund E, Britton T, Concha H, Hassan M, Ryden M, Frisen J, Arner P** (2008) Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* **453**: 783-787

- Stanford KI, Middelbeek RJ, Townsend KL, An D, Nygaard EB, Hitchcox KM, Markan KR, Nakano K, Hirshman MF, Tseng YH, Goodyear LJ** (2013) Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J Clin Invest* **123**: 215-223
- Stephens JM, Morrison RF, Pilch PF** (1996) The expression and regulation of STATs during 3T3-L1 adipocyte differentiation. *J Biol Chem* **271**: 10441-10444
- Stevens VJ, Obarzanek E, Cook NR, Lee IM, Appel LJ, Smith West D, Milas NC, Mattfeldt-Beman M, Belden L, Bragg C, Millstone M, Raczynski J, Brewer A, Singh B, Cohen J** (2001) Long-term weight loss and changes in blood pressure: results of the Trials of Hypertension Prevention, phase II. *Ann Intern Med* **134**: 1-11
- Stolz LE, Li D, Qadri A, Jalenak M, Klamann LD, Tobin JF** (2008) Administration of myostatin does not alter fat mass in adult mice. *Diabetes Obes Metab* **10**: 135-142
- Sugimoto H, Grahovac G, Zeisberg M, Kalluri R** (2007) Renal fibrosis and glomerulosclerosis in a new mouse model of diabetic nephropathy and its regression by bone morphogenetic protein-7 and advanced glycation end product inhibitors. *Diabetes* **56**: 1825-1833
- Sul HS** (2009) Minireview: Pref-1: role in adipogenesis and mesenchymal cell fate. *Mol Endocrinol* **23**: 1717-1725
- Sun B, Huo R, Sheng Y, Li Y, Xie X, Chen C, Liu HB, Li N, Li CB, Guo WT, Zhu JX, Yang BF, Dong DL** (2012) Bone morphogenetic protein-4 mediates cardiac hypertrophy, apoptosis, and fibrosis in experimentally pathological cardiac hypertrophy. *Hypertension* **61**: 352-360
- Sun K, Tordjman J, Clement K, Scherer PE** (2013) Fibrosis and adipose tissue dysfunction. *Cell Metab* **18**: 470-477
- Suzawa M, Takeuchi Y, Fukumoto S, Kato S, Ueno N, Miyazono K, Matsumoto T, Fujita T** (1999) Extracellular matrix-associated bone morphogenetic proteins are essential for differentiation of murine osteoblastic cells in vitro. *Endocrinology* **140**: 2125-2133
- Takashima Y, Era T, Nakao K, Kondo S, Kasuga M, Smith AG, Nishikawa S** (2007) Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell* **129**: 1377-1388
- Tan CK, Leuenberger N, Tan MJ, Yan YW, Chen Y, Kambadur R, Wahli W, Tan NS** (2011) Smad3 deficiency in mice protects against insulin resistance and obesity induced by a high-fat diet. *Diabetes* **60**: 464-476
- Tanaka T, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S** (1997) Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *Embo J* **16**: 7432-7443
- Tang QQ, Otto TC, Lane MD** (2003) Mitotic clonal expansion: a synchronous process required for adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 44-49
- Tang QQ, Otto TC, Lane MD** (2004) Commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 9607-9611
- Tang W, Zeve D, Suh JM, Bosnakovski D, Kyba M, Hammer RE, Tallquist MD, Graff JM** (2008) White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science* **322**: 583-586
- Tanti JF, Ceppo F, Jager J, Berthou F** (2013) Implication of inflammatory signaling pathways in obesity-induced insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)* **3**: 181
- Tavernier G, Barbe P, Galitzky J, Berlan M, Caput D, Lafontan M, Langin D** (1996) Expression of beta3-adrenoceptors with low lipolytic action in human subcutaneous white adipocytes. *J Lipid Res* **37**: 87-97
- Taylor SM, Jones PA** (1979) Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell* **17**: 771-779
- Tchkonia T, Giorgadze N, Pirtskhalava T, Thomou T, DePonte M, Koo A, Forse RA, Chinnappan D, Martin-Ruiz C, von Zglinicki T, Kirkland JL** (2006) Fat depot-specific characteristics are retained in strains derived from single human preadipocytes. *Diabetes* **55**: 2571-2578

- Tchkonia T, Lenburg M, Thomou T, Giorgadze N, Frampton G, Pirtskhalava T, Cartwright A, Cartwright M, Flanagan J, Karagiannides I, Gerry N, Forse RA, Tchoukalova Y, Jensen MD, Pothoulakis C, Kirkland JL (2007)** Identification of depot-specific human fat cell progenitors through distinct expression profiles and developmental gene patterns. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **292**: E298-307
- Timmons JA, Wennmalm K, Larsson O, Walden TB, Lassmann T, Petrovic N, Hamilton DL, Gimeno RE, Wahlestedt C, Baar K, Nedergaard J, Cannon B (2007)** Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 4401-4406
- Tong Q, Dalgin G, Xu H, Ting CN, Leiden JM, Hotamisligil GS (2000)** Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition. *Science* **290**: 134-138
- Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM (1994)** mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev* **8**: 1224-1234
- Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM (1994)** Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* **79**: 1147-1156
- Tontonoz P, Spiegelman BM (2008)** Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu Rev Biochem* **77**: 289-312
- Tordjman J, Divoux A, Prifti E, Poitou C, Pelloux V, Hugol D, Basdevant A, Bouillot JL, Chevallier JM, Bedossa P, Guerre-Millo M, Clement K (2012)** Structural and inflammatory heterogeneity in subcutaneous adipose tissue: relation with liver histopathology in morbid obesity. *J Hepatol* **56**: 1152-1158
- Townsend KL, An D, Lynes MD, Huang TL, Zhang H, Goodyear LJ, Tseng YH (2013)** Increased mitochondrial activity in BMP7-treated brown adipocytes, due to increased CPT1- and CD36-mediated fatty acid uptake. *Antioxid Redox Signal* **19**: 243-257
- Townsend KL, Suzuki R, Huang TL, Jing E, Schulz TJ, Lee K, Taniguchi CM, Espinoza DO, McDougall LE, Zhang H, He TC, Kokkotou E, Tseng YH (2012)** Bone morphogenetic protein 7 (BMP7) reverses obesity and regulates appetite through a central mTOR pathway. *Faseb J* **26**: 2187-2196
- Tran KV, Gealekman O, Frontini A, Zingaretti MC, Morroni M, Giordano A, Smorlesi A, Perugini J, De Matteis R, Sbarbati A, Corvera S, Cinti S (2012)** The vascular endothelium of the adipose tissue gives rise to both white and brown fat cells. *Cell Metab* **15**: 222-229
- Tran TT, Yamamoto Y, Gesta S, Kahn CR (2008)** Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism. *Cell Metab* **7**: 410-420
- Tseng YH, Butte AJ, Kokkotou E, Yechoor VK, Taniguchi CM, Kriauciunas KM, Cypess AM, Niinobe M, Yoshikawa K, Patti ME, Kahn CR (2005)** Prediction of preadipocyte differentiation by gene expression reveals role of insulin receptor substrates and necdin. *Nat Cell Biol* **7**: 601-611
- Tseng YH, Cypess AM, Kahn CR (2010)** Cellular bioenergetics as a target for obesity therapy. *Nat Rev Drug Discov* **9**: 465-482
- Tseng YH, Kokkotou E, Schulz TJ, Huang TL, Winnay JN, Taniguchi CM, Tran TT, Suzuki R, Espinoza DO, Yamamoto Y, Ahrens MJ, Dudley AT, Norris AW, Kulkarni RN, Kahn CR (2008)** New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature* **454**: 1000-1004
- Tsurutani Y, Fujimoto M, Takemoto M, Irisuna H, Koshizaka M, Onishi S, Ishikawa T, Mezawa M, He P, Honjo S, Maezawa Y, Saito Y, Yokote K (2011)** The roles of transforming growth factor-beta and Smad3 signaling in adipocyte differentiation and obesity. *Biochem Biophys Res Commun* **407**: 68-73
- Urist MR (1965)** Bone: formation by autoinduction. *Science* **150**: 893-899
- Ussar S, Lee KY, Dankel SN, Boucher J, Haering MF, Kleinridders A, Thomou T, Xue R, Macotela Y, Cypess AM, Tseng YH, Mellgren G, Kahn CR (2014)** ASC-1, PAT2, and P2RX5 are cell surface markers for white, beige, and brown adipocytes. *Sci Transl Med* **6**: 247ra103

- Uusitupa M, Lindi V, Louheranta A, Salopuro T, Lindstrom J, Tuomilehto J** (2003) Long-term improvement in insulin sensitivity by changing lifestyles of people with impaired glucose tolerance: 4-year results from the Finnish Diabetes Prevention Study. *Diabetes* **52**: 2532-2538
- van der Kruijsen CM, Feijen A, Huylebroeck D, van den Eijnden-van Raaij AJ** (1993) Modulation of activin expression by type beta transforming growth factors. *Exp Cell Res* **207**: 407-412
- van der Lans AA, Hoeks J, Brans B, Vijgen GH, Visser MG, Vosselman MJ, Hansen J, Jorgensen JA, Wu J, Mottaghy FM, Schrauwen P, van Marken Lichtenbelt WD** (2013) Cold acclimation recruits human brown fat and increases nonshivering thermogenesis. *J Clin Invest* **123**: 3395-3403
- van der Lans AA, Wierts R, Vosselman MJ, Schrauwen P, Brans B, van Marken Lichtenbelt WD** (2014) Cold-activated brown adipose tissue in human adults: methodological issues. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **307**: R103-113
- Van Harmelen V, Reynisdottir S, Eriksson P, Thorne A, Hoffstedt J, Lonnqvist F, Arner P** (1998) Leptin secretion from subcutaneous and visceral adipose tissue in women. *Diabetes* **47**: 913-917
- Van Harmelen V, Rohrig K, Hauner H** (2004) Comparison of proliferation and differentiation capacity of human adipocyte precursor cells from the omental and subcutaneous adipose tissue depot of obese subjects. *Metabolism* **53**: 632-637
- van Marken Lichtenbelt WD, Schrauwen P** (2011) Implications of nonshivering thermogenesis for energy balance regulation in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **301**: R285-296
- Vijgen GH, Bouvy ND, Teule GJ, Brans B, Hoeks J, Schrauwen P, van Marken Lichtenbelt WD** (2012) Increase in brown adipose tissue activity after weight loss in morbidly obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* **97**: E1229-1233
- Villarroya J, Cereijo R, Villarroya F** (2013) An endocrine role for brown adipose tissue? *Am J Physiol Endocrinol Metab* **305**: E567-572
- Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, Taittonen M, Laine J, Savisto NJ, Enerback S, Nuutila P** (2009) Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* **360**: 1518-1525
- Wabitsch M, Brenner RE, Melzner I, Braun M, Moller P, Heinze E, Debatin KM, Hauner H** (2001) Characterization of a human preadipocyte cell strain with high capacity for adipose differentiation. *Int J Obes Relat Metab Disord* **25**: 8-15
- Wabitsch M, Bruderlein S, Melzner I, Braun M, Mechttersheimer G, Moller P** (2000) LiSa-2, a novel human liposarcoma cell line with a high capacity for terminal adipose differentiation. *Int J Cancer* **88**: 889-894
- Wagner DO, Sieber C, Bhushan R, Borgermann JH, Graf D, Knaus P** (2010) BMPs: from bone to body morphogenetic proteins. *Sci Signal* **3**: mr1
- Walker GE, Marzullo P, Verti B, Guzzaloni G, Maestrini S, Zurleni F, Liuzzi A, Di Blasio AM** (2008) Subcutaneous abdominal adipose tissue subcompartments: potential role in rosiglitazone effects. *Obesity (Silver Spring)* **16**: 1983-1991
- Walsh DW, Godson C, Brazil DP, Martin F** (2010) Extracellular BMP-antagonist regulation in development and disease: tied up in knots. *Trends Cell Biol* **20**: 244-256
- Wang EA, Israel DI, Kelly S, Luxenberg DP** (1993) Bone morphogenetic protein-2 causes commitment and differentiation in C3H10T1/2 and 3T3 cells. *Growth Factors* **9**: 57-71
- Wang F, Mullican SE, DiSpirito JR, Peed LC, Lazar MA** (2013) Lipoatrophy and severe metabolic disturbance in mice with fat-specific deletion of PPARgamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 18656-18661
- Wang Q, Zhang M, Ning G, Gu W, Su T, Xu M, Li B, Wang W** (2011) Brown adipose tissue in humans is activated by elevated plasma catecholamines levels and is inversely related to central obesity. *PLoS One* **6**: e21006

- Wang QA, Tao C, Gupta RK, Scherer PE** (2013) Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat Med* **19**: 1338-1344
- Wang S, Hirschberg R** (2011) Y-box protein-1 is a transcriptional regulator of BMP7. *J Cell Biochem* **112**: 1130-1137
- Weiskirchen R, Meurer SK, Gressner OA, Herrmann J, Borkham-Kamphorst E, Gressner AM** (2009) BMP-7 as antagonist of organ fibrosis. *Front Biosci (Landmark Ed)* **14**: 4992-5012
- Wetzel P, Haag J, Campean V, Goldschmeding R, Atalla A, Amann K, Aigner T** (2006) Bone morphogenetic protein-7 expression and activity in the human adult normal kidney is predominantly localized to the distal nephron. *Kidney Int* **70**: 717-723
- Whittle AJ, Carobbio S, Martins L, Slawik M, Hondares E, Vazquez MJ, Morgan D, Csikasz RI, Gallego R, Rodriguez-Cuenca S, Dale M, Virtue S, Villarroja F, Cannon B, Rahmouni K, Lopez M, Vidal-Puig A** (2012) BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell* **149**: 871-885
- Wikstrom JD, Mahdavian K, Liesa M, Sereda SB, Si Y, Las G, Twig G, Petrovic N, Zingaretti C, Graham A, Cinti S, Corkey BE, Cannon B, Nedergaard J, Shrihai OS** (2014) Hormone-induced mitochondrial fission is utilized by brown adipocytes as an amplification pathway for energy expenditure. *Embo J* **33**: 418-436
- Willette RN, Gu JL, Lysko PG, Anderson KM, Minehart H, Yue T** (1999) BMP-2 gene expression and effects on human vascular smooth muscle cells. *J Vasc Res* **36**: 120-125
- Winnier G, Blessing M, Labosky PA, Hogan BL** (1995) Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev* **9**: 2105-2116
- Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA** (1988) Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* **242**: 1528-1534
- Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J** (1994) Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* **370**: 341-347
- Wu J, Bostrom P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, Khandekar M, Virtanen KA, Nuutila P, Schaart G, Huang K, Tu H, van Marken Lichtenbelt WD, Hoeks J, Enerback S, Schrauwen P, Spiegelman BM** (2012) Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* **150**: 366-376
- Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM** (1999) Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* **98**: 115-124
- Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, McKeon C, Darlington GJ, Spiegelman BM** (1999) Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell* **3**: 151-158
- Wu Z, Wang S** (2013) Role of kruppel-like transcription factors in adipogenesis. *Dev Biol* **373**: 235-243
- Wynn TA** (2008) Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* **214**: 199-210
- Xue R, Wan Y, Zhang S, Zhang Q, Ye H, Li Y** (2014) Role of bone morphogenetic protein 4 in the differentiation of brown fat-like adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **306**: E363-372
- Yadav H, Quijano C, Kamaraju AK, Gavrilova O, Malek R, Chen W, Zerfas P, Zhigang D, Wright EC, Stuelten C, Sun P, Lonning S, Skarulis M, Sumner AE, Finkel T, Rane SG** (2011) Protection from obesity and diabetes by blockade of TGF-beta/Smad3 signaling. *Cell Metab* **14**: 67-79
- Yamamoto Y, Gesta S, Lee KY, Tran TT, Saadatirad P, Kahn CR** (2010) Adipose depots possess unique developmental gene signatures. *Obesity (Silver Spring)* **18**: 872-878
- Yamauchi T, Kadowaki T** (2013) Adiponectin receptor as a key player in healthy longevity and obesity-related diseases. *Cell Metab* **17**: 185-196

- Yang YL, Liu YS, Chuang LY, Guh JY, Lee TC, Liao TN, Hung MY, Chiang TA** (2009) Bone morphogenetic protein-2 antagonizes renal interstitial fibrosis by promoting catabolism of type I transforming growth factor-beta receptors. *Endocrinology* **150**: 727-740
- Yeh WC, Bierer BE, McKnight SL** (1995) Rapamycin inhibits clonal expansion and adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 11086-11090
- Yeh WC, Cao Z, Classon M, McKnight SL** (1995) Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev* **9**: 168-181
- Zaragosi LE, Wdziekonski B, Villageois P, Keophiphath M, Maumus M, Tchkonja T, Bourlier V, Mohsen-Kanson T, Ladoux A, Elabd C, Scheideler M, Trajanoski Z, Takashima Y, Amri EZ, Lacasa D, Sengenès C, Ailhaud G, Clement K, Bouloumie A, Kirkland JL, Dani C** (2010) Activin a plays a critical role in proliferation and differentiation of human adipose progenitors. *Diabetes* **59**: 2513-2521
- Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, Chandraker A, Yuan X, Pu WT, Roberts AB, Neilson EG, Sayegh MH, Izumo S, Kalluri R** (2007) Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med* **13**: 952-961
- Zeisberg M, Bottiglio C, Kumar N, Maeshima Y, Strutz F, Muller GA, Kalluri R** (2003) Bone morphogenic protein-7 inhibits progression of chronic renal fibrosis associated with two genetic mouse models. *Am J Physiol Renal Physiol* **285**: F1060-1067
- Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, Mammoto T, Charytan D, Strutz F, Kalluri R** (2003) BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med* **9**: 964-968
- Zeng J, Jiang Y, Xiang S, Chen B** (2011) Serum bone morphogenetic protein 7, insulin resistance, and insulin secretion in non-diabetic individuals. *Diabetes Res Clin Pract* **93**: e21-24
- Zhang H, Bradley A** (1996) Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. *Development* **122**: 2977-2986
- Zhang K, Guo W, Yang Y, Wu J** (2011) JAK2/STAT3 pathway is involved in the early stage of adipogenesis through regulating C/EBPbeta transcription. *J Cell Biochem* **112**: 488-497
- Zhang L, Huang H, Zhou F, Schimmel J, Pardo CG, Zhang T, Barakat TS, Sheppard KA, Mickanin C, Porter JA, Vertegaal AC, van Dam H, Gribnau J, Lu CX, ten Dijke P** (2012) RNF12 controls embryonic stem cell fate and morphogenesis in zebrafish embryos by targeting Smad7 for degradation. *Mol Cell* **46**: 650-661
- Zhang X, Zhang J, Bauer A, Zhang L, Selinger DW, Lu CX, Ten Dijke P** (2013) Fine-tuning BMP7 signalling in adipogenesis by UBE2O/E2-230K-mediated monoubiquitination of SMAD6. *Embo J* **32**: 996-1007
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM** (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**: 425-432
- Zhong L, Wang X, Wang S, Yang L, Gao H, Yang C** (2013) The anti-fibrotic effect of bone morphogenic protein-7(BMP-7) on liver fibrosis. *Int J Med Sci* **10**: 441-450
- Zhu H, Kavsak P, Abdollah S, Wrana JL, Thomsen GH** (1999) A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature* **400**: 687-693
- Ziccardi P, Nappo F, Giugliano G, Esposito K, Marfella R, Cioffi M, D'Andrea F, Molinari AM, Giugliano D** (2002) Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year. *Circulation* **105**: 804-809
- Zilberfarb V, Pietri-Rouxel F, Jockers R, Krief S, Delouis C, Issad T, Strosberg AD** (1997) Human immortalized brown adipocytes express functional beta3-adrenoceptor coupled to lipolysis. *J Cell Sci* **110 (Pt 7)**: 801-807

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Mol Biol Cell **13: 4279-4295**

Title:

Roles of Bone Morphogenetic Proteins in adipose conversion and human adipose tissue development

Abstract

Adipocytes (cells specialized in fat storage) arise from immature cells, called progenitor cells, during the process of adipogenesis. In human, the different stages of adipogenesis are not well defined as well as the signals involved in adipogenic modulation. The first part of my thesis work aimed to characterize the intermediate cell state between progenitor cell and mature adipocyte: the preadipocyte. The second part aimed to evaluate the role of bone morphogenetic proteins (BMPs) in human adipogenesis. In mice, BMP2 and BMP4 induce classical adipogenesis whereas BMP7 leads to the production of “brite” adipocytes with the capacity to use lipids to produce heat. We have shown that BMP2, 4 and 7 are produced in human fat depots and BMP7 is modulated by obesity. BMP2 and 4 induce classical adipogenesis and BMP7 only induces brite adipogenesis from human progenitor cells. These works improve our knowledge about the mechanisms involved in the expansion of fat depot and may allow the identification of new strategies to fight against the development of obesity-associated pathologies.

Adipogenesis, Bone Morphogenetic Proteins, Progenitor cells, Obesity, Adipose tissue location

Physiopathologie

INSERM/UPS UMR1048, I2MC, équipe 1

Thèse présentée et soutenue par Nathalie Boulet

Le 30 janvier 2015 à Toulouse

Ecole doctorale Biologie Santé Biotechnologies, spécialité Physiopathologie

ROLES DES BONE MORPHOGENETIC PROTEINS DANS LA CONVERSION ADIPOCYTAIRE ET LE
DEVELOPPEMENT DU TISSU ADIPEUX HUMAIN

Unité de recherche : INSERM/UPS UMR1048 - I2MC, équipe 1

Sous la direction des docteurs Jean Galitzky et Anne Bouloumié

Les adipocytes (cellules spécialisées dans le stockage des graisses) sont formés à partir de cellules immatures appelées cellules progénitrices lors du processus d'adipogenèse. Chez l'homme, les différentes étapes de ce processus sont mal connues ainsi que les signaux qui le régulent. La première partie de mon travail de thèse a eu pour but de caractériser la cellule intermédiaire entre la cellule progénitrice et l'adipocyte : le préadipocyte. La deuxième partie a consisté à évaluer le rôle des protéines morphogénétiques de l'os (ou BMP), des inducteurs de l'adipogenèse décrits chez la souris, dans l'adipogenèse humaine. Nous avons montré que les BMP2, 4 et 7 sont produites dans le tissu gras humain et BMP7 est modulée par l'obésité. Les BMP2 et 4 induisent l'adipogenèse des cellules progénitrices humaines mais seule la BMP7 permet la production d'adipocytes particuliers « beiges » décrits pour consommer les lipides et produire de la chaleur. Ces travaux affinent nos connaissances sur les mécanismes impliqués dans l'expansion du tissu gras et permettront d'élaborer des stratégies pour lutter contre le développement des pathologies liées à l'obésité.

Adipogenèse, Bone Morphogenetic Proteins, Cellules progénitrices, Obésité, Localisation du tissu adipeux